

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES
BERBERINBRÜCKENENZYMS AUS ZELLKULTUREN
VON BERBERIS BEANIANA SCHNEID

PAUL STEFFENS

Diss
München
1983

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES
BERBERINBRÜCKENENZYMS AUS ZELLKULTUREN
VON BERBERIS BEANIANA SCHNEID.

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Paul Steffens
aus
Karlsruhe

Juli 1984

1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk

2. Referent: Doz. Dr. J. Stöckigt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1984

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	18
1. Material	18
1.1. Biologisches Material	18
1.1.1. Bakterien	18
1.1.2. Mäuse	20
1.1.3. Pflanzenmaterial	20
1.2. Chemikalien	21
1.3. Geräte	22
2. Methoden	23
2.1. Synthesen	23
2.1.1. Darstellung von S-Adenosyl-L- ($^{14}\text{CH}_3$)-methionin und S-Aden- osyl-L-(C^3H_3)-methionin	23
2.1.2. Synthese von (S)-Scoulerin und (S)-Coreximmin	25
2.1.3. Synthese der (R)- und (S)-Re- tikulin-N-Oxide	26
2.2. Gewinnung zellfreier Enzympräparatio- nen	27
2.2.1. Herstellung eines zellfreien Rohextraktes aus Mäuseleber nach KAMETANI <u>et al.</u> (1977) ..	27
2.2.2. Aufschluß differenzierter Pflanzen	27
2.2.3. Gewinnung zellfreier Enzymex- trakte aus pflanzlichen Zell- suspensionskulturen	27
2.3. Enzymtests	28
2.3.1. Norretikulin-N-Methyltrans- ferase	28
2.3.2. (S)-Tetrahydroprotoberberin- Oxidase	29
2.3.3. Leitenzyme für verschiedene Organelle	30

	Seite
2.4. Quantitative Bestimmung von (S)-Retikulin	31
2.5. Quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid	31
2.6. Kinetische Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Enzymsätzen	31
2.7. Proteinbestimmungen	32
2.8. Radioaktivitätsbestimmungen	32
2.9. Chromatographische Methoden	33
2.10. Elektrophoretische Methoden, Gelfärbungen	35

III. ERGEBNISSE

1. Entwicklung von Methoden zur Messung des Berberinbrückenenzym	39
1.1. Präparation einer Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase aus <u>Berberis wilsoniae</u> var. <u>subcaulialata</u> Schneid.-Zellkultur	41
1.2. Identifizierung des Enzymprodukts der gereinigten Norretikulin-N-Methyltransferase als Retikulin	45
1.3. Darstellung von (R)- und (S)-($N^{14}CH_3$)- bzw. -(NC^3H_3)-Retikulin	46
1.4. Messung des enzymkatalysierten Tritium-Ausbaus aus (NC^3H_3)-Retikulin (Tritium-Ausbaute)	52
1.5. Chromatographischer Nachweis des Berberinbrückenenzym	54
2. Taxonomische Verbreitung und Stereoselektivität des Berberinbrückenenzym	55
3. Versuche zur Demonstration der Berberinbrückenenzymaktivität in Enzympräparationen aus Mäuseleber	73
4. Kinetik der Berberinbrückenenzym-Bildung in <u>Berberis beaniana</u> Schneid.-Zellkultur	79
5. Reinigung des Berberinbrückenenzym aus <u>Berberis beaniana</u> Schneid.-Zellkultur	82

	Seite
5.1. Interferenz der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase im Tritium-Ausbau-test	82
5.2. Zellaufschluß, Rohextraktgewinnung und Voranreicherung des Berberinbrückenenzym	86
5.3. Gelfiltration an Ultrogel AcA 54	89
5.4. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel	91
5.5. Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose	93
5.6. Präparative Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen	95
5.7. Isoelektrische Fokussierung	96
5.8. Dokumentation des Anreicherungsverfahrens und der Homogenität des gereinigten Berberinbrückenenzym durch SDS-Gelelektrophorese	101
6. Charakterisierung des Berberinbrückenenzym	104
6.1. Produktidentifizierung	104
6.2. Cofaktorabhängigkeit, Stöchiometrie und Isotopeneffekt der Berberinbrückenenzym-Reaktion	109
6.3. pH-Optimum	116
6.4. Temperatur-Optimum	118
6.5. Bestimmung des isoelektrischen Punktes	120
6.6. Molekulargewichtsbestimmung	122
6.7. Substratspezifität	124
6.8. Substratabhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion	132
6.9. Hemmstoffe	134
6.10. Stabilität des Berberinbrückenenzym	138
6.11. Intrazelluläre Verteilung des Berberinbrückenenzym	141

	Seite
IV. DISKUSSION	144
V. ZUSAMMENFASSUNG	160
VI. LITERATURVERZEICHNIS	165

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

B-MSH	B-Mercaptoäthanol
Ci	Curie ($1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$)
cpm	Zählrate (counts per minute)
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FG	Frischgewicht
FMN	Flavin-Mononukleotid
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
kat	Katal (1 Katal entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
MG	Molekulargewicht
NAD(P)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat), reduziert
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
w	Gewicht

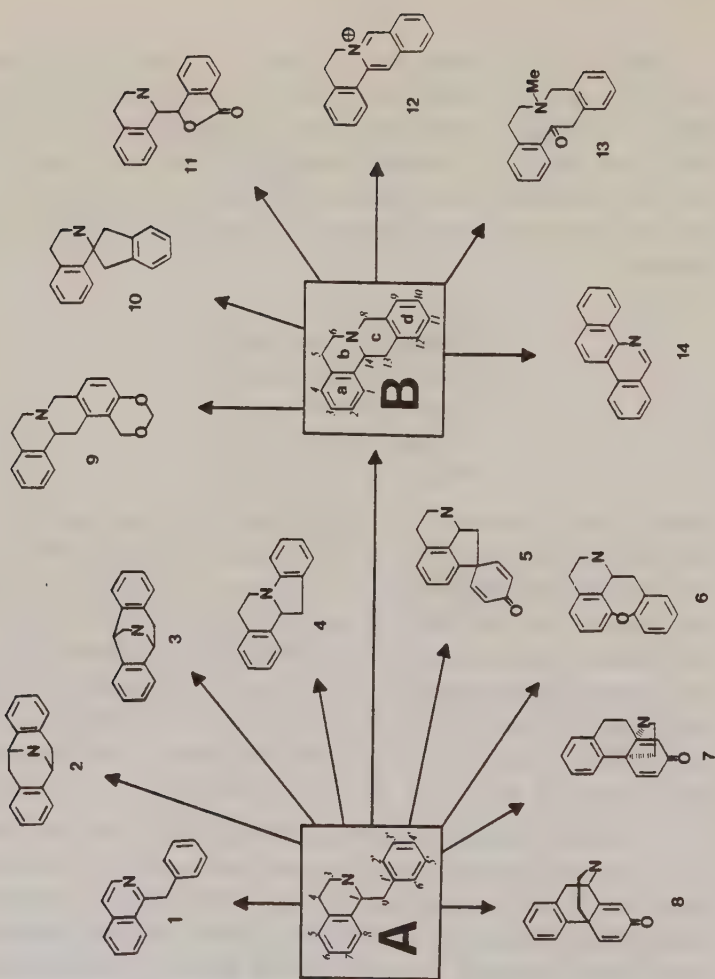
I. E I N L E I T U N G

Unter den Naturstoffen bilden die Alkaloide diejenige Gruppe, die den größten Reichtum an molekularer Vielgestaltigkeit aufweist. Diese Feststellung MOTHES' (1969) läßt sich eindrucksvoll belegen am Beispiel der Isochinolinalkaloide. KAMETANI und FUKUMOTO (1973) führen die Formenvielfalt dieser Alkaloidklasse auf sechs Grundstrukturen zurück:

1. einfache Isochinoline
2. Alkylisochinoline
3. Phenylisochinoline
4. 1-Benzylisochinoline
5. 2-Benzylisochinoline
6. Phenyläthylisochinoline

Unter ihnen leisten die 1,2,3,4-Tetrahydroderivate der 1-Benzylisochinoline den größten Beitrag zur molekularen Vielfalt der Alkaloidklasse. Das liegt einmal an der großen Anzahl der von ihnen biogenetisch abgeleiteten Alkaloidtypen, zum anderen an der strukturellen Komplexität und Verschiedenartigkeit, die diese Verbindungen auszeichnet. Sie ist zum Teil so weitreichend, daß die gemeinsame Abstammung bestimmter Alkaloide vom Benzylisochinolingrundskelett nicht mehr ohne weiteres erkennbar ist (vgl. Abb 1).

Mit gewissen Einschränkungen treffen diese Aussagen auch auf die Tetrahydroprotoberberine zu. Diese Alkaloide leiten sich direkt von den 1,2,3,4-Tetrahydro-1-Benzylisochinolin ab (s. u.) und bilden ihrerseits den biogenetischen Ausgangspunkt für eine Reihe weiterer Abkömmlinge, die ebenfalls beträchtliche Unterschiede in ihrer Struktur aufweisen (vgl. Abb. 1). So sind die 1,2,3,4-Tetrahydro-1-Benzylisochinolin- und die Tetrahydroprotoberberinalka-



loide hauptverantwortlich für die imposante strukturelle Mannigfaltigkeit, die die Alkaloidklasse der Isochinoline aufzuweisen hat.

Viele Vertreter dieser Alkaloidklasse sind identifiziert worden als wirksame Prinzipien traditioneller Heilpflanzen und gekennzeichnet durch ganz unterschiedliche, ausgeprägte pharmakologische Wirkungen. Einige von ihnen werden therapeutisch genutzt. Unter den 1-Benzylisochinolinalkaloiden ist hier das Papaverin an erster Stelle zu nennen, das (1848) erstmals von MERCK aus Opium isoliert wurde. Es ist bekannt als potenter Inhibitor pathologischer Spasmen der glatten Muskulatur (PREININGER, 1975); heute werden vielfach Derivate dieser Verbindung mit modifizierten Substituenten therapeutisch eingesetzt (AUTERHOFF, 1978). Das Phthalidisochinolin Narkotin, ein weiteres Hauptalkaloid aus Opium, wird als zentral-hustenhemmendes, nicht analgetisch wirkendes Mittel genutzt (AUTERHOFF, 1978). Berberin, das namensgebende Alkaloid der Klasse der Protoberberine, zeichnet sich durch entzündungshemmende und weitgefächerte antimikrobielle Eigenschaften aus. Es wird als intestinales Antiseptikum (FUKUI et al., 1982) und in Augentropfen zur Therapie von Reizzuständen der Bindehaut verwendet. Einige Berberinderivate zeigen darü-

Abb. 1: 1,2,3,4-Tetrahydro-1-Benzylisochinolin (A) und Tetrahydroprotoberberin (B) als zentrale Grundstrukturen in der Biosynthese von 14 verschiedenen Alkaloidtypen (ohne Berücksichtigung nur mittelbar abgeleiteter und dimerisierter Alkaloide). 1. Benzylisochinoline; 2. Pavine; 3. Isopavine; 4. Dibenzopyrrocoline; 5. Proaporphine; 6. Cularine; 7. Hasubanane; 8. Morphinandienone; 9. Retroprotoberberine; 10. Ochotensane (Spirobenzylisochinoline); 11. Phthalidisochinoline; 12. Quaternäre Protoberberine; 13. Protopine; 14. Benzophenanthridine. Verändert nach SHAMMA (1972), JEFFS und SCHARVER (1976) und CORDELL (1981).

ber hinaus Aktivität gegen bestimmte lymphozytische Leukämiesysteme in Mäusen. Als Wirkungsmechanismus beider Effekte wird die Fähigkeit des Berberinkerns diskutiert, mitochondrial DNA zu interkalieren und dadurch Konfigurationsänderungen hervorzurufen (SHAMMA, 1972; CORDELL, 1981).

Das wissenschaftliche Interesse, das die Isochinolinalkaloide schon seit dem vorigen Jahrhundert genießen, geht jedoch nicht ausschließlich auf ihre bemerkenswerten pharmakologischen Wirkungen zurück. Durch ihre vielschichtige Zusammensetzung zog diese Substanzklasse auch die Aufmerksamkeit der Systematiker und chemotaxonomisch orientierten Botaniker auf sich. Besonders von den komplexeren und abgeleiteteren Strukturen, die vielstufige Biosynthesewege voraussetzen, versprach man sich eine beträchtliche taxonomische Signifikanz, da eine konvergente Ausbildung dieser Verbindungen in nicht-verwandten Pflanzen statistisch unwahrscheinlich ist (SEIGLER, 1977). Diese Erwartung trifft im allgemeinen auch zu. So konstatiert ROBINSON (1968), daß die Ähnlichkeit in der Struktur der Alkaloide, die zwei Pflanzen aufweisen, um so ausgeprägter ist, je niedriger der taxonomische Rang ist, dem diese beiden Pflanzen angehören - kurz: ihr Verwandtschaftsgrad spiegelt sich in der Ähnlichkeit ihrer Alkaloide wider.

Legt man das taxonomische System von FROHNE und JENSEN (1979) zugrunde, so bilden die Magnoliidae das Verbreitungszentrum der Benzylisochinolinalkaloide (HEGNAUER, 1984). Diese Subklasse wird durch kein anderes chemotaxonomisches Merkmal ähnlich eindeutig charakterisiert (SEIGLER, 1977). Das schließt allerdings weder aus, daß sie auch eine Ordnung ohne Isochinolinalkaloide enthält (die Piperales), noch daß Benzylisochinolinalkaloide auch außerhalb der Magnoliidae anzutreffen sind (vgl. Abb. 2). Die sich von den Benzylisochinolinalkaloiden ableitenden (Tetrahydro)Protoberberine zeigen ein etwas begrenzteres, im wesentlichen

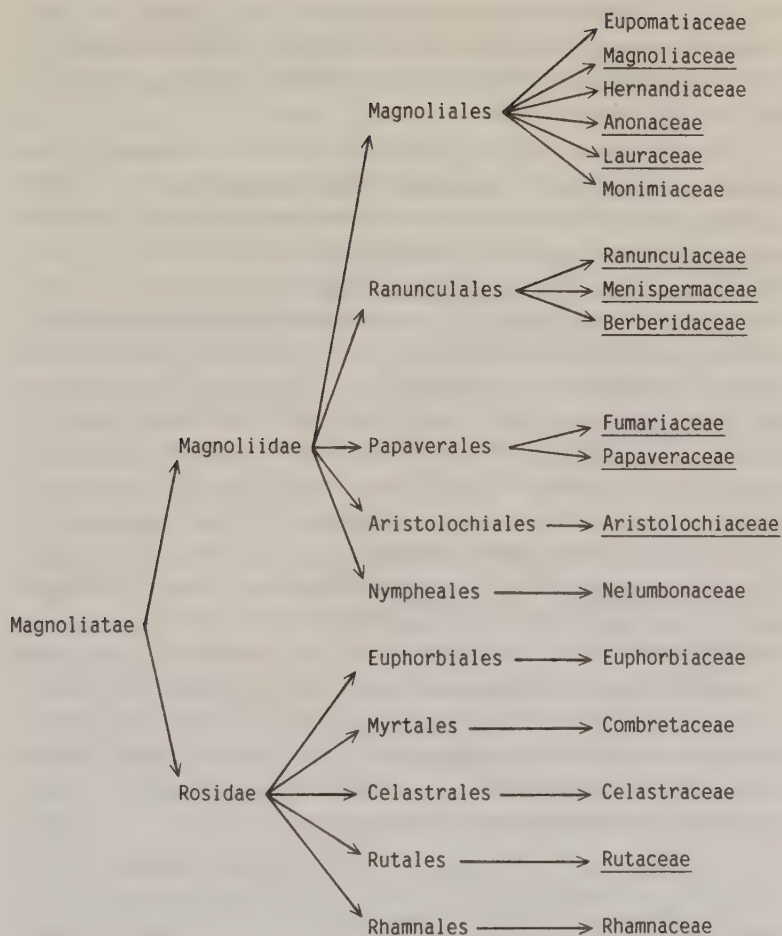


Abb. 2: Taxonomische Verbreitung der Benzyloisochinolin- und Protoberberinalkaloide (unterstrichen) nach JEFFS (1967), SHAMMA (1972) und SEIGLER (1977). Systematische Kategorisierung nach FROHNE und JENSEN (1979).

jedoch ähnliches Verbreitungsspektrum (vgl. Abb. 2). Ganz charakteristisch sind sie für die Familien Berberidaceae (Genus Berberis) und Fumariaceae (Genera Corydalis und Dicentra) (SEIGLER, 1977).

Verschiedentlich ist über das Vorkommen von Benzyloisochinolinalkaloiden in systematischen Kategorien berichtet worden, die vom taxonomischen Standpunkt her wenig plausibel erscheinen. Beispielsweise isolierten KATSUI et al. (1966) aus Lysichiton camtschacense, einem Vertreter der Aronstabgewächse, die 1,2,3,4-Dehydroaporphinderivate Liriodenin und Lysicamine. JEFFS (1967) notierte das Vorkommen des Protoberberins Palmatin in Calystegia hydraceae. Die Convolvulaceae, zu denen diese Schlingpflanze zählt, gehören nicht zu den Pflanzenfamilien, die durch Isochinolinalkaloide charakterisiert sind (vgl. Abb. 2). PAKRASHI et al. (1983) identifizierten Bharatamin, ein ungewöhnlich substituiertes Protoberberinalkaloid, als Inhaltsstoff von Alangium lamarckii (Alangiaceae). Befunde dieser Art mögen dazu beigetragen haben, daß MOTHES (1969) den sekundären Inhaltsstoffen eine weit geringere systematische Verbindlichkeit beimißt als den sekundären (nicht lebensnotwendigen) morphologischen Merkmalen. Er betont daher die überlegene taxonomische Aussagekraft, die vergleichende biosynthetische Untersuchungen gegenüber dem rein formalen Vergleich der Sekundärstoffe bieten.

Mutmaßungen zur Biosynthese der Benzyloisochinolinalkaloide sind erstmals zu Beginn dieses Jahrhunderts geäußert worden. (1911) berichteten PICTET und SPENGLER über die Kondensation von Phenyläthylamin und Formaldehyd zu 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin; die Leichtigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, führte sie zu der Vermutung, daß in Pflanzen die Tetrahydroisochinolinalkaloide nach einer analogen Reaktion gebildet werden. Einen entsprechenden Vorschlag machten WINTERSTEIN und TRIER (1910) zur Biosyn-

these der Benzylisochinoline. Sie postulierten, daß Tetrahydropapaverin, ein Vertreter dieser Alkaloidklasse, biogenetisch aus der Kondensation von β -(3,4-dimethoxyphenyl)-Äthylamin und 3,4-Dimethoxyphenylacetaldehyd entsteht. Diese Vorstellung griff ROBINSON (1917) auf; er nahm jedoch die O-demethylierten Derivate der von WINTERSTEIN und TRIER (1910) postulierten Verbindungen als Vorstufen an. Später (1937) stellte SCHÖPF fest, daß in der Tat eine freie Hydroxylfunktion des Phenyläthylamins in p-Stellung zu der Position des Ringschlusses erforderlich ist, um die Reaktion unter zellmöglichen Bedingungen ablaufen zu lassen. SPÄTH et al. (1936, 1937) wiesen jedoch auf die geringere Reaktivität von Phenylacetaldehyden (im Vergleich beispielsweise zu Formaldehyd) hin und berichteten, daß ihre Kondensation mit Phenyläthylaminen unter milden Bedingungen erhebliche Schwierigkeiten bereitet. HAHN und STIEHL (1936, 1938) äußerten daher die Vermutung, daß nicht Aldehyde, sondern die entsprechenden α -Ketosäuren den physiologischen carbonylischen Reaktionspartner darstellen, der, anschließend an die Kondensierung, eine Decarboxylierung erfährt. SCHÖPF und SALZER hingegen demonstrierten (1940), daß Dopamin mit Homopiperonal (3,4-Methylenedioxyphenylacetaldehyd) durchaus unter physiologischen Bedingungen kondensiert; die Reaktion erfolgt sogar weitaus schneller als mit der entsprechenden α -Ketosäure. Diesen kontroversen Ansichten zur Biosynthese der Benzylisochinolinalkaloide muß jedoch die Übereinstimmung aller genannten Konzepte in zwei grundlegenden Punkten gegenübergestellt werden:

1. Die biogenetischen Vorstufen der Benzylisochinolinalkaloide sind Derivate der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin.
2. Die Vorstufen verbinden sich miteinander in einer Reaktion, die man als das biologische Äquivalent einer Man-

nich-Kondensation ansprechen kann.

Diesen Reaktionstyp (Kondensation einer Carbonylverbindung, ursprünglich Formaldehyd, mit einem Amin zur intermediären Schiff'schen Base; anschließende Kondensation mit einem nukleophilen C-Atom) bezeichnete WOODWARD (1956) als eine biogenetische Fundamentalreaktion. Sind das Amin und der nukleophile Kohlenstoff Bestandteil eines Moleküls, wie das beim Phenyläthylamin der Fall ist, erfolgt die Reaktion mit gleichzeitiger Zyklisierung.

Nach demselben Reaktionsmuster lassen sich auch Tetrahydroprotoberberinalkaloide aus den Benzylisochinolinolen ableiten und darstellen. Das demonstrierten erstmals PICTET und GAMS (1911) durch die Umsetzung von Veratryl-Norhydrohydrastinin mit Methylal zum Tetrahydroprotoberberin. Sie zogen die Möglichkeit in Betracht, daß auch die Pflanzen die Protoberberinalkaloide in dieser Weise synthetisieren. Allerdings zeigten HAWORTH et al. (1924), daß das Produkt der Pictet-Gams-Kondensation nicht das eigentliche Protoberberin, sondern seine isomere Pseudoform ist, die am D-Ring Substituenten in den Positionen 10 und 11 (statt 9 und 10) trägt (vgl. Abb. 1). Nur mit phenolischen Benzylisochinolinolen (beispielsweise Papaverolin) als Substrat führt die Reaktion zum Teil zum wirklichen Protoberberinalkaloid (SPÄTH und KRUTA, 1928). Da Protoberberine weit häufiger als ihre Pseudoisomeren als Naturstoffe nachgewiesen wurden (ROBINSON, 1955), büßte die Pictet-Gams-Umsetzung etwas von ihrem Modellcharakter für die Biosynthese der Protoberberinalkaloide ein. Trotzdem galt sie für viele Jahrzehnte als die plausibelste Denkmöglichkeit (vgl. ROBINSON, 1955; WOODWARD, 1956).

Eine alternative Sichtweise artikulierte erst (1959, 1962) WENKERT. Ausgehend vom gerade etablierten Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren, postulierte er Prephen-säure als eigentliche Vorstufe sowohl der Benzylisochino-

lin- als auch der Protoberberinalkaloide. Nach seiner Theorie werden diese beiden Alkaloidtypen unabhängig voneinander durch Kondensation unterschiedlicher C_6-C_2 -Einheiten gebildet, die sich von Prephensäure biogenetisch ableiten. Das zusätzliche C-Atom, das die Protoberberine gegenüber den Benzylisochinolininen besitzen - die sogenannte Berberinbrücke, die nach der klassischen Hypothese erst nach der Bildung des Benzylisochinolinskeletts eingeführt wird - , soll schon vor der Kondensation in dem N-haltigen Reaktionspartner enthalten sein (vgl. Abb. 3).

Eine neue Epoche in der Biosyntheseforschung wurde etwa in der Mitte dieses Jahrhunderts eingeleitet, als organische Verbindungen in isotopenmarkierter Form verfügbar wurden (BATTERSBY, 1963). Die dadurch ermöglichten Tracertechniken gestatteten nun eine direkte experimentelle Überprüfung der einzelnen Hypothesen. Die biosynthetische Umwandlung einer aromatischen Aminosäure in ein Benzylisochinolinalkaloid demonstrierten (1959) erstmals KLEINSCHMIDT und MOTHES. Sie fütterten ($U-^{14}C$)-L-Tyrosin an isolierte Blätter, Kapseln und Milchsaft von Papaver somniferum und konnten jeweils neben anderen Alkaloiden radioaktives Papaverin isolieren. Noch im selben Jahr (1959) führten BATTERSBY und HARPER einen entsprechenden Versuch mit spezifisch ($2-^{14}C$)-markiertem D,L-Tyrosin durch; schrittweiser Abbau des biosynthetisch gebildeten Papaverins zeigte, daß ausschließlich die C-Atome 1 und 3 markiert waren (vgl. Abb. 1). Die Autoren folgerten, daß zwei Tyrosin-Einheiten am Aufbau des Alkaloids beteiligt sind.

Zu völlig kongruenten Ergebnissen kamen GEAR und SPENSER (1963), die die Biosynthese des Berberins in Hydrastis canadensis untersuchten. MONKOVIČ und SPENSER (1965) konnten darüber hinaus zeigen, daß ($1-^{14}C$)-Dopamin nur in den Isochinolinteil des Berberins eingebaut wird.

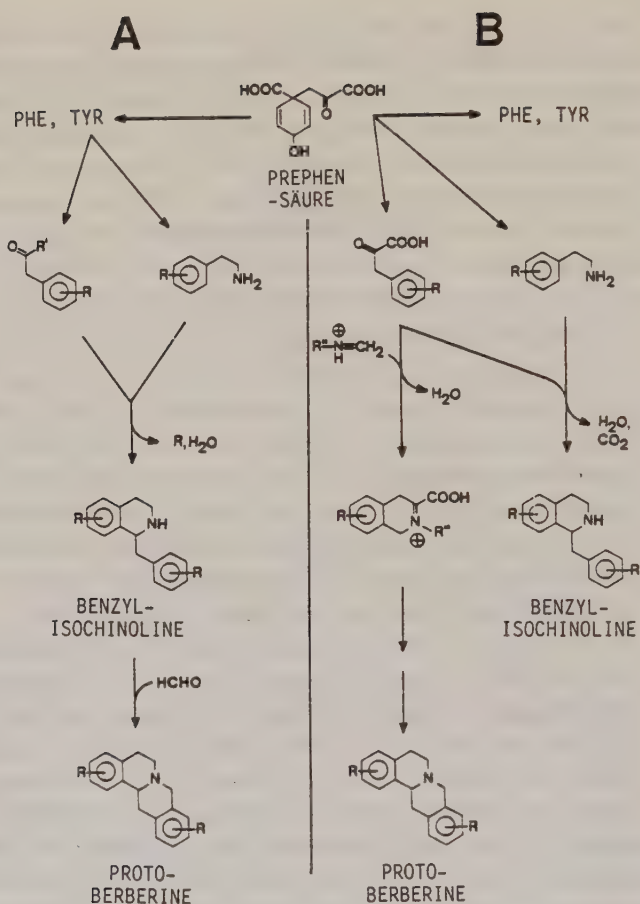


Abb. 3: Vergleich der klassischen Aminosäurehypothese (WINTERSTEIN und TRIER, 1910; PICTET und GAMS, 1911; ROBINSON, 1955) (A) und WENKERT's (1959, 1962) Prephensäurehypothese (B) zur Biosynthese der Benzylisochinolin- und Protoberberinalkaloide. Verändert nach WENKERT (1959) und GEAR und SPENSER (1963).

Die Analogie der Resultate suggerierte eine enge biogenetische Verwandtschaft der Benzylisochinolin- und Protoberberinalkaloide und lieferte damit wichtige Hinweise für die Richtigkeit der klassischen Aminosäurehypothese. Ihre eindeutige Bestätigung blieb jedoch Versuchen vorbehalten, in denen die Metabolisierung der postulierten unmittelbaren Vorstufen, der Benzylisochinoline, zu Protoberberinen demonstriert wurde.

BARTON und Mitarbeiter verabreichten (1963) doppelt markiertes Retikulin (Abb. 4) an Hydrastis canadensis und konnten radioaktives Berberin isolieren. Ein anderes Benzylisochinolinalkaloid, Laudanosolin (Abb. 4), wurde von BATTERSBY et al. (1963) in markierter Form an Berberis japonica verfüttert; auch hier war Berberin das isolierte Biosyntheseprodukt. Diese Befunde bestätigten die Benzylisochinolinalkaloide als biosynthetische Vorstufe der Protoberberine und widerlegten eindeutig und unmittelbar Wenkert's Hypothese zur Biosynthese der Protoberberinalkaloide. In beiden Arbeiten wurden N-Methylmarkierte Vorstufen eingesetzt und gezeigt, daß diese Markierung vollständig im C-Atom 8 des Berberins erhalten bleibt. Damit war zusätzlich die N-Methylgruppe der Benzylisochinolinalkaloide als biogenetische Vorstufe der Berberinbrücke identifiziert. Als Reaktionsmechanismus postulierten beide Autorengruppen eine oxidative Zyklisierung der N-Methylgruppe, möglicherweise über eine Imminium-Zwischenform (Abb. 4). In dieser Hinsicht widerlegten die Befunde die klassische Biosynthesetheorie, die eine Mannich-Kondensation zwischen Benzylisochinolininen und einem Formaldehydäquivalent gefordert hatte. Daß sich das C-8 des Berberins tatsächlich von einer C-1 Vorstufe ableitet, konnten (1965) GUPTA und SPENSER durch den spezifischen Einbau von S-¹⁴CH₃-markiertem Methionin zeigen. Mit diesem Resultat wurde eine Spekulation experimentell fundiert, die bereits (1953) SRIBNEY und KIRK-

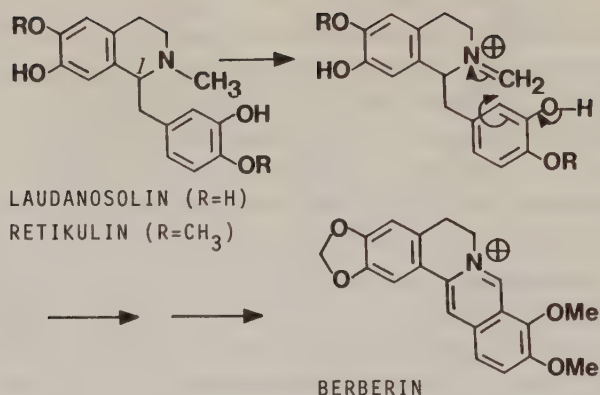


Abb. 4: Postulierter Mechanismus der Berberinbrückenbildung. Nach BARTON et al. (1963) und BATTERSBY et al. (1963).

WOOD im Zusammenhang mit ihrer Untersuchung der Biosynthese des Protopins geäußert hatten.

An die Etablierung der Benzyloisochinoline als Vorstufen der Protoberberinalkaloide schloß sich eine Reihe von Fütterungsexperimenten an, in denen die Metabolisierung dieser Verbindungen zu weiteren, strukturell verwandten Alkaloiden untersucht wurde. Hierbei kristallisierte sich Retikulín als eine biosynthetische Schlüsselsubstanz heraus. Dieses Alkaloid verdankt seinen Namen dem Vorkommen in der Anonacee Anona reticulata, aus deren Wurzelrinde es (1959) erstmals isoliert wurde (GOPINATH et al.). Wie alle Tetrahydrobenzyloisochinoline weist Retikulín am C-Atom 1 ein asymmetrisches Zentrum auf (Abb. 4). Wurde es zunächst

als optisch reines (S)-Enantiomer* gewonnen, so berichteten (1964) BROCHMANN-HANSSEN und FURUYA die Isolierung racemischen Retikulins aus Opium. Später wurden Retikulin-Präparate von unterschiedlicher optischer Reinheit aus Papaver somniferum isoliert (BROCHMANN-HANSSEN und NIELSEN, 1965; BATTERSBY et al., 1965a; WIECZOREK, pers. Mitteilung). BATTERSBY et al. (1965c) erklärten diese Befunde mit einem enzymkatalysierten Oxidations-Reduktions-Gleichgewicht zwischen den beiden enantiomeren Retikulinmolekülen über eine 1,2-Dehydroform. (S)-Retikulin erwies sich als effiziente, stereospezifische Vorstufe des Tetrahydroprotoberberins (S)-Stylopin (BATTERSBY et al., 1965b; 1975a). Wie die Autoren durch Verfütterung dieser Verbindung in mehrfach markierter Form an Chelidonium majus zeigen konnten, bleibt bei dieser Umwandlung das Chiralitätszentrum C1 und das C-Atom 9 des Substrats (vgl. Abb. 1) unversehrt. (S)-Retikulin wurde ebenfalls stereoselektiv in die (Tetrahydro)protoberberinalkaloide Berberin (BARTON et al., 1965a), (S)-Scoulerin (Abb. 5) und (S)-Cheilanthifolin (FURUYA et al., 1978), (S)-Stepholidin, (S)-Corydalmin, (S)-Capaurin und (S)-Corynoxidin (BHAKUNI et al., 1983a), in das Benzophenanthridinalkaloid Chelidonin (BATTERSBY et al., 1965b) sowie in Protopin (BARTON et al., 1965a) eingebaut. Lediglich das Phthalidisochinolinalkaloid Narcotin, das ebenfalls C-1 (S)-Konfiguration aufweist, wurde in Papaver somniferum scheinbar stereounspezifisch aus (R)- wie aus (S)-Retikulin biosynthetisiert (BATTERSBY und HIRST, 1965); dieser Befund erklärt sich jedoch aus der erwähnten Umwand-

* Die Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-1 beruht auf der Untersuchung von CORRODI und HARDEGGER (1956), die (-)-N-Norlaudanolin zu (+)-Laudanosin einerseits und zu einem L-Asparaginsäurederivat bekannter absoluter (S)-Konfiguration andererseits umsetzten.

lungsmöglichkeit der Retikulin-Enantiomere ineinander, die in dieser Pflanze nachgewiesen wurde (BATTERSBY et al., 1965c).

Die Einheitlichkeit, die die genannten Fütterungsexperimente in stereochemischer Hinsicht kennzeichnet, veranlaßte SPENSER (1968) zu der verallgemeinernden Mutmaßung, daß die Alkaloide mit Berberinbrücke dem einen ((S)-), die ohne Berberinbrücke dem anderen ((R)-) Enantiomer des Retikulins biogenetisch entstammen. Eine solche Annahme wirft jedoch die Frage auf, wie die natürlichen Tetrahydroprotoberberinalkaloide mit (R)-Konfiguration biosynthetisiert werden (vgl. MANSKE und ASHFORD, 1954; BOIT, 1960; JEFFS, 1967). Daß sie zumindest nicht einschränkungslos gilt, zeigten kürzlich (1983b) BHAKUNI et al., die die Bildung des Tetrahydroprotoberberins (R)-Sinactin aus markiertem (R)-Retikulin in der Menispermacee Cocculus laurifolius nachwiesen. Allerdings bestätigt auch dieser Befund, wenn gleich mit umgekehrtem Vorzeichen, die stereoselektive Natur der Umwandlung von Benzylisochinolininen zu Protoberberinalkaloiden. Offensichtlich ist die Stereokonfiguration der Benzylisochinolinalkaloide entscheidend für ihr biosynthetisches Schicksal. Dieser Umstand verleiht der Frage, in welcher stereochemischen Form diese Alkaloide in der Pflanze gebildet werden, besonderes Gewicht. Ihre Beantwortung gelang (1981) RUEFFER et al., die in zellfreien Extrakten verschiedener pflanzlicher Zellkulturen (S)-Norlaudanolin als erstes Biosyntheseprodukt mit Benzylisochinolinstruktur identifizierten. Als spezifische Substrate der enzymkatalysierten Reaktion, die zur Bildung des Norlaudanolins führt, dienen Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd; entsprechend substituiertes Phenylpyruvat wird nicht metabolisiert. Mit diesem Befund wurde die eingangs erwähnte, seit fast einem halben Jahrhundert umstrittene Frage nach der Identität der Carbonylkomponente in

dieser biosynthetischen Schlüsselreaktion entschieden. Ein anderes Resultat der genannten Untersuchung ist die Beobachtung, daß die Kondensierungsreaktion auch nicht-enzymkatalysiert, d.h. nicht-stereospezifisch abläuft. So ist leicht vorstellbar, daß Benzylisochinolinalkaloide in der Pflanze als partielle Razemate mit mehr oder weniger ausgeprägtem Überschuß des S-Enantiomers vorliegen. Benzylisochinolin-spezifische Methyltransferasen, die von RUEFFER et al. (1983 b) und WAT et al. (1984) aus unterschiedlichen pflanzlichen Suspensionskulturen isoliert wurden, zeigten keine klare Präferenz für ein Enantiomer ihrer jeweiligen Substrate. Die biosynthetische Kontrolle, die die Pflanze durch die Stereoselektivität ihrer Enzyme ausübt, beschränkt sich also (soweit untersucht) einerseits auf die Eingangsreaktion zu den Benzylisochinolin, andererseits auf die Reaktionen, in denen diese Alkaloide in andere Strukturtypen überführt werden (die Protoberberine wurden hier nur exemplarisch genannt). In dieser Situation sind Enzyme, die die optischen Antipoden der Benzylisochinolinalkaloide ineinander umwandeln können, von zentraler regulatorischer Bedeutung. Hinweise für die Existenz einer derartigen Razemase in Papaver somniferum sind angeführt worden (s.o.). Darüber hinaus konnte AMANN (1982) aus Zellkulturen der Gattung Berberis ein Enzym isolieren, das stereospezifisch (S)-N-Norretikulin in sein 1,2-Dehydroderivat überführen kann. Die physiologische Signifikanz dieser Umsetzung wurde jedoch in Frage gestellt durch den Befund, daß dieselbe homogene Enzympräparation auch sehr effizient (S)-Tetrahydroprotoberberine zu quaternären Protoberberinium-Salzen oxidiert (AMANN et al., 1984).

Abgesehen von diesen Arbeiten ist der pflanzliche Benzylisochinolinstoffwechsel auf zellfreiem Niveau bislang nur unter Verwendung razemischer Substrate untersucht worden. So berichteten (1975) RINK und BÖHM über die Metabo-

lisierung von (R,S)-Retikulín zu Scoulerín (Abb. 5) durch einen zellfreien Extrakt, den sie aus *Macleaya microcarpa*-Zellsuspensionskulturen gewinnen konnten. Sie reicherten das verantwortliche Enzym 7-fach an und nannten es nach seiner Funktion: Berberinbrückenenzym (BÖHM und RINK, 1975).

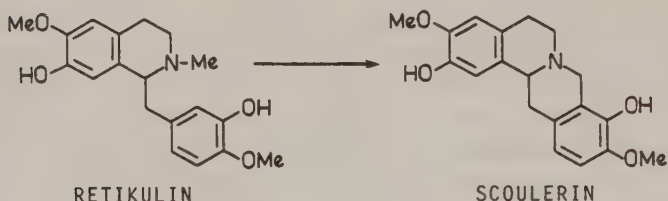


Abb. 5: Reaktion des Berberinbrückenenzym (nach RINK und BÖHM, 1975).

Die Autoren stellten fest, daß das Enzym seine katalytische Aktivität nur in Gegenwart von Sauerstoff, jedoch unabhängig von Cofaktoren entfaltet. Sein pH-Optimum lag im Bereich von 7,5 - 8,2. Unter fünf getesteten Substraten setzte das Enzym neben (R,S)-Retikulín lediglich (R,S)-Laudanidin (vgl. Abb. 32) um. Gegenüber den übrigen Substraten kennzeichnet diese beiden Alkaloide eine Hydroxylfunktion in 3'-Position (vgl. Abb. 1). Dieser Substituent war bereits früher als möglicherweise essentiell für die biosynthetische Ausbildung der Berberinbrücke angesehen worden (BARTON, 1963; BARTON et al., 1965a; SCHÜTTE, 1969; vgl. Abb. 4). BÖHM und RINK (1975) interpretierten ihre Befunde als Hinweis auf die Richtigkeit dieser Hypothese. Darüber hinaus konnten sie das Enzym in einigen differenzierten Pflanzen nachweisen, die Protoberberinalkaloide enthalten. Aus dem ge-

meinsamen Auftreten schlossen sie auf eine funktionelle Beziehung zwischen dem Enzym und der Protoberberinalkaloid-Biosynthese.

Evidenz für die Anwesenheit der Berberinbrückenenzym-Aktivität in einem Rohextrakt aus Berberis aggregata-Kalluskultur lieferten KELLEHER et al. (1980). Sie demonstrierten die Metabolisierung von (R,S)-Retikulin in Gegenwart von ^{14}C -markiertem S-Adenosylmethionin zu den Protoberberinen Palmatin und Columbamin.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in vitro-Umsetzung der Benzylisochinoline zu Alkaloiden vom Protoberberintyp in stereochemischer Hinsicht zu untersuchen. Dies umfaßte die Darstellung spezifisch markierter Substrate in optisch reiner Form, den Nachweis der Berberinbrückenenzym-Aktivität in unterschiedlichen pflanzlichen Zellkulturen sowie differenzierten Pflanzen und schließlich die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung dieses biosynthetischen Schlüsselenzyms.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Biologisches Material

1.1.1. Bakterien

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung einer S-Adenosyl-methionin (SAM)-Synthetase (ATP:L-Methionin S-Adenosyl-transferase, E.C. 2.5.1.6.) diente eine metJ-Mutante von Escherichia coli K-12 (Stamm EWH 47), die mir freundlicherweise von Prof. Floss (West-Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Im Gegensatz zum Wildtyp ist bei dieser Mutante die Reprimierbarkeit der SAM-Synthetase aufgehoben (SU und GREENE, 1971), wodurch das Bakterium eine besonders geeignete Quelle für das Enzym darstellt. Es wurde in LB-Vollmedium (SCOTT, 1968) kultiviert, das folgende Zusammensetzung hatte: 10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco) und 10 g NaCl, jeweils pro Liter Medium. Der pH-Wert wurde mit Tris auf 7,8 eingestellt. Festmedium enthielt zusätzlich 10 g Agar (Difco) pro Liter. Erhaltungskulturen wurden in 2-monatigen Abständen auf Agarplatten subkultiviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Gewinnung größerer Bakterienmengen wurde zunächst eine Suspensions-Vorkultur von 30 ml bei 37°C schüttelnd (250 Upm) bebrütet, bis eine Extinktion von ca. 5 bei 600 nm erreicht war. Mit dieser Kultur wurde ein 20 l Fermenter (23 cm ϕ x 50 cm Höhe) inokuliert, der zuvor mit 10 l LB-Vollmedium und 2 ml Silicon-Antischaumemulsion (Roth, Karlsruhe) gefüllt und autoklaviert (30 min., 1,2 atü, 120°C) worden war. Die Fermentation erfolgte bei 37°C und unter ständiger Agitation durch ein Rührwerk (ca. 60 Upm) bis zum Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase (Abb. 6). Die Bakterien wurden anschließend

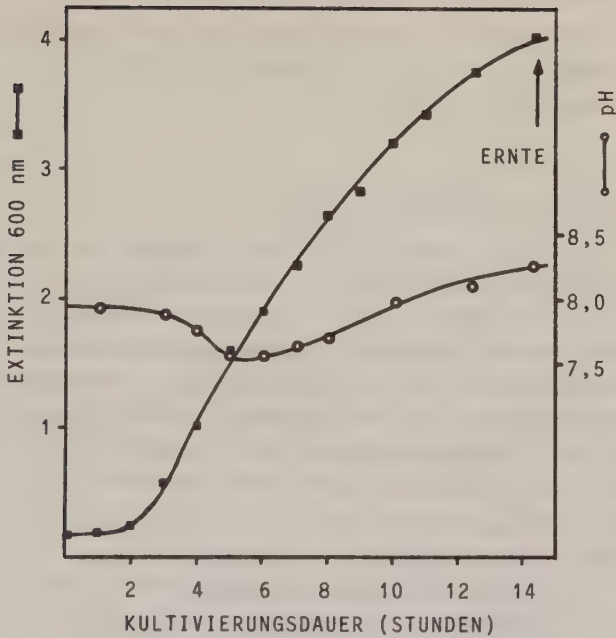


Abb. 6: Kultivierungskinetik von *Escherichia coli* K-12 metJ. Die Anzucht erfolgte unter den im Text angegebenen Bedingungen.

sedimentiert (Sorvall GS 3-Rotor; 10 min., 12000 g), mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug 3,2 g Feuchtmasse pro Liter Medium.

1.1.2. Mäuse

Zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion aus Mäuseleber wurden etwa 30 g schwere, 4 Monate alte männliche Tiere des Stammes balb c benutzt.

1.1.3. Pflanzenmaterial

Die pflanzlichen Zellkulturen stammten aus der Zellkultursammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie, München. Sie wurden aus steril gekeimten Samen oder aus Explantaten von Pflanzen gewonnen, die von botanischen Gärten aus aller Welt zur Verfügung gestellt worden waren. Berberis beaniana Schneid. stammte aus Genf, Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid. aus Wageningen (Niederlande). Diese Kulturen wurden 1978 etabliert.

Für die Anzucht der Kulturen wurden, wie im einzelnen angegeben, folgende Medien verwendet:

LS nach LINSMAIER und SKOOG (1965);

4x nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert nach ZENK et al. (1977);

B5CM modifiziert nach GAMBORG et al. (1968): B5-Medium, versetzt mit 200 ml Kokosnußmilch und 2,0 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure pro Liter Medium.

Zur Produktion größerer Mengen (bis zu ca. 5 kg) Gewebematerial wurden Suspensionskulturen in 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium auf Rotationsschüttlern (100 Upm) bei 600 Lux Dauerlicht und 23°C angezogen. Die Subkultivierung erfolgte in 7- bis 12-tägigen Abständen, wobei etwa 50 ml der Vorkultur als Inokulum verwendet wurden. Das Zellmaterial wurde durch Filtration vom Kulturmedium getrennt und, sofern es nicht sofort benutzt wurde, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -25°C aufbewahrt.

Die untersuchten differenzierten Pflanzen waren aus Samenmaterial angezogen worden, das aus verschiedenen botanischen Gärten stammte. Die Anzucht erfolgte in Frühbeeten oder Gewächshäusern des Dachgartens des Instituts für Pharmazeutische Biologie, wie im einzelnen angegeben.

Für die Anzucht der Zellkulturen und der differenzierten Pflanzen danke ich Frau Hinz und Herrn Nagy.

1.2. Chemikalien

Natrium-Ascorbat, Wasserstoffperoxid, Triäthanolamin, β -Mercaptoäthanol, Glycin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Äthylendiamintetraessigsäure (Di-Natrium-Salz), Natrium-Dodecylsulfat und o-Phenantrolin stammten von der Firma Merck (Darmstadt). Aktivkohle, Dextran, 4-Aminoantipyrin, Tricin, Glutathion, Dithioerythritol, p-Hydroxymercuribenzoessäure, α,α -Dipyridyl, Diäthylthiocarbamat, Morin und 2,4-Pentandion lieferte Sigma (München), Coomassie Blue G 250, Ferritin, N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid und Jodosobenzoessäure die Firma Serva (Heidelberg). Adenosin-5'-triphosphat, S-Adenosylmethionin, die verwendeten Pyridinnukleotide und Cytochrom c wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen.

DEAE-Sephacel, CM-Sephadex CL-6B, Sephadex G 25, Phenyl-Sephadex, Polybuffer 94-Exchanger, Polybuffer 74 und die Eichproteine für die Molekulargewichtsbestimmung stammten von Pharmacia (Freiburg), Ultrogel AcA 54 von der Firma LKB (Bromma, Schweden).

Die verwendeten Radiochemikalien L-(C^3H_3)-Methionin, L-($^{14}CH_3$)-Methionin und S-Adenosyl-L-($^{14}CH_3$)-methionin wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

Von den verwendeten Alkaloiden stammte (R,S)-Laudanosin von Aldrich Chemie (Milwaukee, USA), (R,S)-Laudanosolin von Ega Chemie (Steinheim) und (R,S)-Laudanidin von Merck. Alle anderen Alkaloide wurden von Prof. Nagakura (Kobe, Japan)

synthetisiert, dem ich an dieser Stelle für die Überlassung der Substanzen herzlich danken möchte.

1.3. Geräte

UV-Spektren wurden an einem DMR 11-Spektralphotometer der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen; für photometrische Enzymtests wurde ein Zeiss PMQ 2-Photometer benutzt. Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 44S registriert (mit Elektronenionisation, wenn nicht anders angegeben). Optische Drehwerte wurden mit einem Polarimeter Typ 241 (Perkin-Elmer, Überlingen) in einer 1 ml-Küvette bestimmt.

Der pH-Wert und die Leitfähigkeit von Lösungen wurden mit einem Digitalmeter Digi 610 (WTW, Weilheim) bestimmt, die Zuckerkonzentration wurde mit einem Abbé Refraktometer (Zeiss) gemessen.

Zentrifugationen wurden in einer gekühlten Zentrifuge des Typs Sorvall Superspeed RC 58 mit den Rotoren SS 34 oder GSA (DuPont Instruments, USA) bzw. in einer Ultrazentrifuge (UZ L2) der Firma Beckman (München) mit einem Spinco SW 25.2-Rotor durchgeführt. Für die Zentrifugation von Enzyminkubationsansätzen wurde eine Tischzentrifuge der Firma Eppendorf (Hamburg) vom Typ 5412 benutzt.

Zur Vakuum-Ultrafiltration von Proteinlösungen in Kollodiumhülsen wurde eine Apparatur von Sartorius (Göttingen) mit der Bezeichnung SM 16304 eingesetzt.

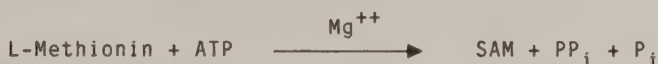
Für Enzymreinigungen wurde eine Chromatographiestation der Firma LKB benutzt, bestehend aus einem Fraktionskollektor Ultrorac 7000, einem UV-Detektor Uvicord III, einer peristaltischen Pumpe Varioperpex 12000 und einem Gradientenformer Ultrograd 11300. Für die Elektrophoresen wurde ein Netzgerät vom Typ 2103 (LKB) verwendet.

2. Methoden

2.1. Synthesen

2.1.1. Darstellung von S-Adenosyl-L- $(^{14}\text{CH}_3)$ -methionin und S-Adenosyl-L- (C^3H_3) -methionin

Die Darstellung markierter SAM-Präparate erfolgte enzymatisch mit Hilfe der SAM-Synthetase, die folgende Reaktion katalysiert (CANTONI, 1965):



Die Enzymaktivität wurde in Anlehnung an die Methode von TABOR und TABOR (1970) bestimmt. Testansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,15 ml 60 μmol Triäthanolamin/HCl, pH 8,2, 12 μmol MgSO_4 , 12 μmol KCl, 1,2 μmol ATP (neutralisiert mit NaOH), 1,2 μmol NaCN, 30 nmol ($\cong$ 75 nCi) L- $(^{14}\text{CH}_3)$ -Methionin und bis zu 150 μg Protein. Sie wurden bei 37°C inkubiert; 10 μl -Aliquots wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und in Laufmittelsystem 1 (vgl. II.2.9.) chromatographiert. Die Radioaktivitätsverteilung der Chromatogramme wurde mit dem Dünnschichtscanner bestimmt und zur Ermittlung des Umsatzes bzw. der Enzymaktivität (100 % Umsatz $\cong$ 30 nmol Produktbildung) herangezogen.

Die SAM-Synthetase wurde folgendermaßen aus E. coli K-12 metJ isoliert: Etwa 1,5 g der tiefgefrorenen Bakterienmasse wurden in 5 ml 80 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,8, der 20 mM β -MSH enthielt, aufgenommen und bei Raumtemperatur gerührt, bis eine homogene Suspension entstanden war. Die Zellen wurden aufgeschlossen, indem eine gekühlte Suspension einer fünfmaligen Ultraschallbehandlung von je 20 Sekunden Dauer und maximaler Intensität unterzogen wurde (Sonifier S 125, Branson, Danbury, USA). Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (20 min., 10000 g) ent-

fernt; der Überstand wies eine Gesamtaktivität von 2,7 nkat und eine spezifische Aktivität von 100 pkat/mg Protein auf. Versuche, die SAM-Synthetase anzureichern, erwiesen sich als unzweckmäßig. Einerseits waren hohe Einbußen an Enzymaktivität zu verzeichnen (beispielsweise führte eine Grobfractionierung des Rohextraktes an Sephadex G 25 zu 70 %igem Aktivitätsverlust), andererseits setzte schon der Rohextrakt L-Methionin vollständig und ausschließlich zu SAM um (vgl. II.2.9.; Laufmittelsysteme 1-4; Rf (Methionin)= 0,40; 0,80; 0,80; 0,60; Rf (SAM)= 0,05; 0,10; 0,30; 0,15).

Die präparative Darstellung von ^{14}C - und ^3H -markiertem SAM wurde in Ansätzen folgender Zusammensetzung durchgeführt:

Ansatz	A	B
Triäthanolamin/HCl, pH 8,3	0,5 mmol	1,6 mmol
MgSO ₄	0,5 mmol	1,6 mmol
KCl	0,5 mmol	1,8 mmol
NaCN	20 µmol	40 µmol
ATP	160 µmol	200 µmol
L-($^{14}\text{CH}_3$)-Methionin	250 µCi	---
(spez. Akt.: 60 Ci/mol)	4,2 µmol	---
L-(C^3H_3)-Methionin	---	10 mCi
(spez. Akt.: 88 Ci/mmol)	---	114 nmol
Bakterienextrakt (Protein)	8,6 mg	17,2 mg
Gesamtvolumen	5,5 ml	19,2 ml

Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 1). Ansatz A zeigte nach 6-, Ansatz B nach 3-stündiger Inkubation bei

30°C vollständige Umsetzung des L-Methionins zu SAM. Ansatz B wurde durch Gefriertrocknung auf 4 ml eingeeengt; beide Ansätze wurden bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren aufbewahrt.

2.1.2. Synthese von (S)-Scoulerin und (S)-Coreximin

(S)-Scoulerin, das mutmaßliche Enzymprodukt, und Coreximin wurden nach der Methode von BATTERSBY et al. (1966) aus (S)-Norretikulin synthetisiert. 120 mg (S)-Norretikulin·HCl wurden in 5 ml Methanol gelöst, mit 15 ml H₂O versetzt und mit 5 % NaHCO₃ auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt. Nach Zugabe von 4,6 ml 35 %-igem Formaldehyd wurde der pH-Wert erneut mit 5 % NaHCO₃ auf den ursprünglichen Wert eingestellt, wobei der Ansatz sich allmählich trübte. Nach 16-stündiger Reaktion bei Raumtemperatur war dünn-schichtchromatographisch kein Norretikulin (Rf= 0,60), sondern ausschließlich Scoulerin (Rf= 0,80) und Coreximin (Rf= 0,70) nachweisbar (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 5). Methanol wurde im Vakuum aus dem Ansatz entfernt, 25 ml H₂O zugesetzt und der Ansatz bei pH 8,1 mit 3 x 50 ml CHCl₃ extrahiert. Der Rückstand der vereinigten organischen Phasen wurde in 5 ml Methanol aufgenommen. Unlösliche Bestandteile (62 mg) wurden abfiltriert und aus Äthanol/CHCl₃ umkristallisiert. Die Kristalle (26 mg) wurden als (S)-Coreximin identifiziert:

Dünnschichtchromatographie: Laufmittelsystem 5 (vgl. II.2.9.); Rf= 0,70.

Schmelzpunkt: 248-253°C (Literatur: 254-256°C; BATTERSBY et al., 1966).

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ = 283 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 327 (M⁺, 28), 326 (18), 178 (100), 177 (31), 176 (36), 151 (34), 150 (90).

Das Filtrat wurde evaporiert, in 0,25 ml CHCl_3 aufgenommen und auf eine Al_2O_3 -Säule (Merck, Darmstadt; neutral; Aktivitätsstufe 3; 1,2 cm $\varnothing$ x 8 cm Höhe) aufgetragen. Elution mit CHCl_3 lieferte Scoulerin (24 mg), das aus Äthanol umkristallisiert wurde (11 mg):

Dünnschichtchromatographie: Laufmittelsystem 5 (vgl. II.2.9.): $R_f = 0,80$.

Schmelzpunkt: 194-200°C (Literatur: 198-200°C; BATTERSBY et al., 1966).

UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 283 \text{ nm}$ (Literatur: 283 nm; SHAMMA, 1972).

MS m/z (rel. Int. %): 327 (M^+ , 39), 326 (28), 178 (100), 176 (36), 150 (48), 135 (27).

$[\alpha]_D^{21} = -276^\circ$ ($c = 0,01$ in Methanol) (Literatur: -283° , -289° ; BATTERSBY et al., 1966).

Die Ausbeute an gereinigten Produkten betrug 31 %.

2.1.3. Synthese der (R)- und (S)-Retikulin-N-Oxide

Die Umsetzung der optisch reinen Retikulinpräparate in ihre jeweiligen N-Oxide wurde nach einer (1979) von DAS-GUPTA et al. publizierten Methode durchgeführt. 100 mg (304 μmol) (R)- bzw. (S)-Retikulin in 25 ml CHCl_3 wurden langsam mit 100 mg (581 μmol) m-Chlorperbenzoesäure in 5 ml CHCl_3 versetzt und im Kalten gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 11; R_f (Retikulin) = 0,35; R_f (m-Chlorperbenzoesäure) = 0,90). Bereits nach 15 min. wurde eine vollständige Umsetzung der Substrate zu zwei Produkten mit den R_f -Werten 0,45 und 0,55 registriert. Ihre Isolierung und Identifizierung ist unter III.6.7. beschrieben.

2.2. Gewinnung zellfreier Enzympräparationen

2.2.1. Herstellung eines zellfreien Rohextraktes aus Mäuselieber nach KAMETANI et al. (1977)

Eine Maus wurde durch Luxation der Wirbelsäule getötet und ausgeblutet. Die präparierte Leber (1,6 g) wurde zerkleinert, in 5 ml kaltem Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) suspendiert und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde 30 min. bei 9000 g zentrifugiert und der Überstand auf Biotransformations-Aktivität untersucht.

2.2.2. Aufschluß differenzierter Pflanzen

Die Pflanzen bzw. Pflanzenteile wurden in flüssigem N₂ eingefroren und zerkleinert. Ein Aliquot wurde zur Trockengewichtsbestimmung benutzt, ein weiteres (2-8 g) wurde in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4; 2 ml/g FG) gerührt, bis eine homogene Suspension entstanden war. Sie wurde durch Mull gepresst, der Preßsaft 10 min. bei 20000 g klarzentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen (0-70 % Sättigung) und an Sephadex G 25 (1 cm Ø x 13 cm Höhe) von niedermolekularen Komponenten befreit. Das proteinhaltige Eluat wurde für die enzymatischen Untersuchungen herangezogen.

2.2.3. Gewinnung zellfreier Enzymextrakte aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen

Tiefgefrorenes Zellmaterial (vgl. II.1.1.3.) wurde in kaltem Aufschlußpuffer bei Raumtemperatur bis zum Erreichen einer homogen-breiigen Konsistenz gerührt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter II.2.2.2. beschrieben. Die Menge der Zellmasse, Pufferart und -volumen variierten und

sind im jeweiligen Ergebnisteil spezifiziert.

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Enzymaktivitäten in Berberis beaniana-Suspensionskultur wurde frisch geerntetes Gewebe (2 g FG $\approx$ 0,12 g TG) in folgendem Puffer (2 ml/g FG) suspendiert und im Eis zermörsert (nach BEEVERS et al., 1974):

500 mM Saccharose
150 mM Tricin/NaOH, pH 7,5
10 mM KCl
5 mM Thioglykolsäure
1 mM $MgCl_2$
1 mM Na_2EDTA

Die Suspension wurde durch Mull gepresst und 15 min. bei 270 g zentrifugiert. Der Überstand wurde einer isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Er wurde auf einen linearen Dichtegradienten (Volumen = 48 ml) geschichtet, der den Konzentrationsbereich von 18-60 % (w/w) Saccharose umfaßte (in 50 mM Tricin/NaOH, pH 7,5, und 1 mM Na_2EDTA). Nach 4-stündiger Ultrazentrifugation in einem Schwingbecherrotor bei 23000 Upm (60-90000 g) wurde der Gradient fraktioniert und die Fraktionen à 2,5 ml analysiert. Ihre Dichte wurde refraktometrisch, mehrere Enzymaktivitäten wie angegeben (vgl. II.2.3.) bestimmt.

2.3. Enzymtests

2.3.1. Norretikulin-N-Methyltransferase

Die Aktivität dieses Enzyms wurde mit der Methode von WAT et al. (1984) bestimmt. Testansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,15 ml 15 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,5, 38 nmol (R,S)-Norretikulin-HCl (in 7,5 μ l DMSO), 15 μ mol Natrium-Ascorbat, 10,4 nmol (25 nCi $\approx$ 56000 dpm) ($^{14}CH_3$)-SAM, bis zu 0,1 mg Protein und wurden 60 min. bei 30°C in-

kubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 0,2 ml 0,2 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer, pH 10,0, gestoppt, und die Ansätze wurden mit 0,5 ml Isoamylalkohol extrahiert. Die Radioaktivität der organischen Phase wurde als Maß für den Grad der Umsetzung genommen und zur Berechnung der Enzymaktivität verwendet (100 % Umsatz $\cong$ 10,4 nmol Produktbildung).

Zur Differenzierung zwischen verschiedenen Methylierungsprodukten wurde ein chromatographisches Testverfahren benutzt. Aliquots à 30 μl der oben beschriebenen Inkubationsansätze wurden mit Laufmittelsystem 6 (vgl. II.2.9.) aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung der Chromatogramme analysiert. Die Enzymaktivität wurde über den prozentualen Anteil der methylierten Produkte an der Gesamtradioaktivität ermittelt.

2.3.2. (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase

Das Enzym wurde nach AMANN (1982) mit (R,S)-(C1- ^3H)-Retikulin als Substrat bestimmt. Testansätze enthielten in 250 μl Gesamtvolumen 25 μmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 3,2 nmol (25 nCi $\cong$ 56000 dpm) (R,S)-(C1- ^3H)-Retikulin und unterschiedliche Proteinmengen (< 100 μg). Nach 1-stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze durch Zugabe von 300 μl einer Aktivkohlesuspension (4 g/100 ml) gestoppt, 1 min. geschüttelt, anschließend 5 min. bei 10000 g zentrifugiert (Eppendorf-System) und ein 350 μl -Aliquot des Überstandes zur Radioaktivitätsbestimmung herangezogen. Wegen der Stereospezifität des Enzyms (AMANN, 1982) und der Verwendung razemischen Substrats wurden 50 % der eingesetzten Radioaktivität im Überstand als vollständiger Umsatz bewertet und zur Berechnung der Enzymaktivität herangezogen (100 % Umsatz $\cong$ 1,6 nmol Produktbildung).

2.3.3. Leitenzyme für verschiedene Organelle

Katalase: Als Leitenzym für Microbodies (Glyoxisomen, Peroxisomen) wurde die Katalase nach BERGMEYER et al. (1970) bestimmt. Testansätze enthielten in 700 μ l Volumen 25 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,5, 4,9 μ mol H_2O_2 und maximal 0,15 mg Protein. Der Verlauf der Reaktion bei 27°C wurde photometrisch bei 240 nm verfolgt, die Enzymaktivität über $\epsilon (H_2O_2)_{240 \text{ nm}} = 0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ berechnet. Unter den verwendeten Testbedingungen entsprach eine Extinktionsabnahme von 0,05 pro Sekunde einer Enzymaktivität von 1 μ kat.

Cytochrom c-Reduktase: Die Cytochrom c-Reduktase ist ein Leitenzym für das endoplasmatische Retikulum; ihre Aktivität wurde nach LORD (1983) bestimmt. Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 0,7 ml 23 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,5, 2,2 μ mol NaCN, 18 nmol Cytochrom c (oxidiert), 85 nmol NADH und bis zu 0,15 mg Protein. Sie wurden bei 27°C inkubiert. Der Reaktionsverlauf wurde photometrisch bei 550 nm verfolgt, die Enzymaktivität über $\Delta\epsilon (\text{Cytochrom c}_{\text{red.}} - \text{Cytochrom c}_{\text{ox.}})_{550 \text{ nm}} = 2,1 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mmol}$ (VAN GELDER und SLATER, 1962) berechnet. Unter den verwendeten Testbedingungen entsprach eine Extinktionsänderung von 0,03 pro Sekunde einer Enzymaktivität von 1 nkat.

Cytochrom c-Oxidase: Dieses Enzym ist Bestandteil der Atmungskette und liegt membrangebunden in den Mitochondrien vor. Seine Aktivität wurde nach SIEGMUND et al. (1976) bestimmt. Testansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 700 μ l 25 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,5, 18 nmol Cytochrom c (zuvor mit einer äquimolaren Menge Natrium-Ascorbat reduziert), 2 μ l Tween 80, sowie bis zu 0,15 mg Protein. Inkubation der Ansätze und Analyse der Enzymaktivität erfolgten wie bei der Cytochrom c-Reduktase beschrieben.

2.4. Quantitative Bestimmung von (S)-Retikulin

(S)-Retikulin wurde radioimmunologisch quantifiziert (WIECZOREK et al., in Vorbereitung). Der Radioimmuntest hat einen Meßbereich von 0,05-5 ng (S)-Retikulin/50 µl Analysenlösung. Er besitzt eine hohe Spezifität für (S)-Retikulin; (S)-Scoulerin zeigt eine Kreuzreaktion von weniger als 0,1 %. Frau Wieczorek danke ich für die Unterstützung bei den Analysen.

2.5. Quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid

H₂O₂ wurde mit der Methode von GALLATI (1977) bestimmt. Testansätze bestanden aus 320 µl Analysenlösung mit maximal 25 nmol H₂O₂, 50 µl Meerrettich-Peroxidase (0,1 mg/ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) und 250 µl Farbreagenz folgender Zusammensetzung: 100 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 25 mM Phenol und 1 mM 4-Aminoantipyrin. Unter diesen Bedingungen hängt die Extinktion des Ansatzes bei 505 nm folgendermaßen von der H₂O₂-Menge ab:

$$\frac{E_{505} - 0,014}{8,44 \times 10^{-3}} = n \text{ (H}_2\text{O}_2\text{)} / \text{nmol}$$

Der Titer der H₂O₂-Eichlösung wurde manganometrisch (BERNT und BERGMAYER, 1970; JANDER und BLASIUS, 1973) zu 9,77 M (Nennwert: 9,84 M) bestimmt.

2.6. Kinetische Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Enzymsätzen

Die Menge an gelöstem Sauerstoff in Testansätzen wurde nach COOPER (1981) mit einer Clark'schen Sauerstoffelektrode bestimmt, die eine variable Volumeneinstellung gestattete (Bachofer, Reutlingen). Die Eichung erfolgte bei

25,8°C und einem Druck von 1013 mbar mit O₂-gesättigtem Wasser einerseits (100 % Sättigung $\cong$ 193 mM O₂) und einer frischen Natrium-Dithionit-Lösung (eine Mikrospatelspitze/ml H₂O) andererseits (0 % Sättigung $\cong$ 0 mM O₂). Testansätze, die unter denselben Bedingungen kinetisch gemessen wurden, enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,8 ml 40 µmol Glycin/NaOH, pH 8,9, variable Mengen an (S)-Retikulin-HCl (maximal 14 nmol) und bis zu 30 µg Protein ($\pm$ 1,15 µg Katalase, entsprechend 1,3 µkat). Die zeitliche Änderung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde durch einen Kompensationsschreiber registriert, zu den Eichwerten ins Verhältnis gesetzt und somit quantifiziert.

2.7. Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden nach einem Testverfahren von LOWRY et al. (1951) ermittelt, das nach GERHARDT und BEEVERS (1968) und BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) modifiziert worden war. Durch Verringerung des Ansatzvolumens auf 0,55 ml konnte die Nachweisgrenze auf ca. 1 µg Protein gesenkt werden.

Relative Proteinmengen, etwa in Säuleneluat, wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm oder nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Rinderserumalbumin (Serva) diente in allen Verfahren als Standard.

2.8. Radioaktivitätsbestimmungen

Radioaktivitätsbestimmungen wässriger oder organischer Lösungen wurden im Szintillationszähler Betaszint BF 5004 (Berthold, Wildbad) mit je 5 ml Rotiszint (Roth, Karlsruhe) als Szintillator durchgeführt. Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen wurde entweder

quantitativ mit Dünnschichtscannern (LB 2722-2 und TLC-Linear Analyzer, Berthold) oder, bei zweidimensionaler Auftrennung, qualitativ durch Autoradiographie ermittelt. Auf solche Chromatogramme war eine Gesamtradioaktivitätsmenge von 17 nCi ^{14}C aufgetragen. Curix RP1-Röntgenfilm (50 AFW, Agfa-Gevaert) wurde drei Wochen lang der Bestrahlung durch die Autoradiogramme ausgesetzt und anschließend entwickelt und fixiert (Entwickler: G150; Fixierer: G334; Agfa-Gevaert).

2.9. Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographische Trennungen wurden entweder auf Kieselgelplatten (Polygram Sil G/UV₂₅₄; 0,25 mm Schichtdicke; Macherey und Nagel, Düren) oder auf Celluloseplatten (F₂₅₄; 0,1 mm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die in Tab. 1 aufgelisteten Laufmittelsysteme wurden verwendet.

Zur kinetischen Analyse der enzymkatalysierten Metabolisierung von Alkaloiden wurde die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt. In Anlehnung an STABA et al. (1982) wurden folgende Bedingungen gewählt:

Gerät:	SP 8700 solvent delivery system, SP 4100 computing integrator, SP 8440 UV/vis detector (Spectra Physics, Santa Clara, USA)
Vorsäule:	Vydac-101 SI, 4 mm ϕ x 6 cm Höhe (Macherey und Nagel)
Säule:	Nucleosil 7 C18, 4 mm ϕ x 25 cm Höhe (Macherey und Nagel)
Probe:	20 μl , wässrig; Alkaloidkonzentration: 0,33 mM
Fließmittel:	Methanol : 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ = 75 : 25
Flußrate:	0,8 ml/min.
Detektion:	E ₂₈₃

Laufmittelsystem	Referenz
1. K; Triäthylamin : 1-Propanol : H_2O = 3 : 85 : 15	TABOR und TABOR (1970)
2. C; Isopropanol : Äthanol : 1 N HCl = 30 : 30 : 20	Amersham Buchler, Char- genanalysenblätter
3. C; Äthanol : H_2O : Essigsäure = 65 : 34 : 1	Amersham Buchler, Char- genanalysenblätter
4. K; n-Butanol : H_2O : Essigsäure = 60 : 25 : 15	Amersham Buchler, Char- genanalysenblätter
5. K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 90 : 9 : 1	
6. K; Essigsäureäthylester : Methyläthylketon : $HCOOH$: H_2O = 50 : 30 : 10 : 10	
7. K; Chloroform : Aceton : Diäthylamin = 50 : 40 : 10	
8. K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 90 : 20 : 3	KELLEHER <u>et al.</u> (1980)
9. K; Toluol : Essigsäureäthylester : Diäthyl- amin = 70 : 20 : 10	
10. K; Xylol : Methyläthylketon : Methanol : Diäthylamin = 50 : 50 : 6 : 2	
11. K; Methanol : H_2O : NH_4OH (25 %) = 70 : 30 : 0,36	DASGUPTA <u>et al.</u> (1979)

Tab. 1: Laufmittelsysteme für dünnschichtchromatographische Trennungen (K $\hat{=}$ Kieselgel; C $\hat{=}$ Cellulose).

2.10. Elektrophoretische Methoden; Gelfärbungen

Diskontinuierliche (Disc-) Elektrophorese unter nativen Bedingungen wurde einerseits zur präparativen Proteinreinigung, andererseits als analytische Methode benutzt. Als geeignet erwies sich das Polyacrylamid-Gelsystem Nr. 1 von MAURER (1968); lediglich die Konzentration des Trenngels an Polyacrylamid wurde auf 9 % (w/v) erhöht. Alle nicht-denaturierenden Elektrophoresen wurden in Glasröhrchen von 5,0 mm Innendurchmesser durchgeführt. Trenngele hatten eine Länge von 6,5 cm, Konzentrierungsgele von 1,3 cm. Die Proben hatten Volumina von höchstens 0,15 ml und enthielten bis zu 0,7 mg Protein in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, 10 μ l 87 %-iges Glycerin sowie 5 μ l einer 0,01 %-igen Bromphenolblaulösung zur Frontmarkierung. Die elektrophoretischen Trennungen wurden bei 4°C und einem konstanten Stromfluß von 1,5 mA pro Gelröhrchen durchgeführt; typische Trennzeiten betrugen etwa 4 Stunden. Die Gele wurden entweder Färbeprozeduren unterzogen (s.u.), oder in Fraktionen von 2,2 mm Stärke segmentiert (Bio-Rad Gelschneider 190), die anschließend mit je 2 x 0,2 ml 5 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, unter Agitation bei 4°C erschöpfend extrahiert wurden.

Isoelektrische Fokussierungen wurden in Anlehnung an MAURER (1971) durchgeführt. Rundgele mit den Dimensionen der zuvor genannten Disc-Trenngele und einer Polyacrylamidkonzentration von 7,3 % (w/v) enthielten 2,3 % (w/v) Ampholine (pH 4-6,5; LKB, Bromma, Schweden), die vor der Polymerisation zur Reaktionslösung gegeben wurden. Als Elektrodenlösungen dienten 0,075 N H_2SO_4 (Anode; unteres Pufferreservoir) bzw. 0,075 M Triäthanolamin (Kathode; oberes Pufferreservoir). Die Proben hatten Volumina von etwa 0,75 ml und enthielten in 5 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, bis zu 0,15 mg Protein und 70 μ l 87 %-iges Glycerin. Sie wurden am alkalischen Gelende appliziert, indem eine Schutzlösung

(0,1 ml einer 5×10^{-4} %-igen Bromphenolblaulösung in 3 %-igem Glycerin) unterschichtet wurde. Die Trennung erfolgte bei 4°C und einer konstanten Spannung von 200 V und dauerte etwa 4 Stunden. Während dieser Zeit sinkt der Stromfluß von 0,55 mA pro Gel auf einen konstanten Restwert von 0,03 mA pro Gel; der Frontmarker nähert sich bis auf ca. 0,5 cm dem unteren Gelende, erfährt hier einen Farbumschlag von blau nach gelb und verändert seine Position nicht weiter. Die Extraktion der segmentierten Gele erfolgte wie oben beschrieben; Proteinanalysen der Extrakte war ein Dialyseschritt vorgeschaltet, um interferierende Ampholine abzutrennen.

Denaturierende Elektrophoresen in Anwesenheit von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wurden mit dem diskontinuierlichen System von LAEMMLI (1970) durchgeführt, das (1973) von LAEMMLI und FAVRE detailliert beschrieben wurde. Es wurden Flachgele von 15 cm Breite und 1,5 mm Dicke benutzt. Die Trenngele hatten eine Höhe von 14 cm; Konzentrierungsgele enthielten bei einer Höhe von 3,0 cm neun Taschen von je 8 mm Breite und 15 mm Tiefe für die Probenapplikation. Die Polyacrylamidkonzentration der Trenngele betrug 12,6 %, die der Konzentrierungsgele 4 %. Die zu analysierenden Proben enthielten in einem Volumen von 40 µl 0,4 µmol Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, 40 nmol Na_2 -EDTA, 5 % β -MSH, 5 % Glycerin, 1 % SDS, $1,25 \times 10^{-3}$ % Bromphenolblau und bis zu 25 µg Protein. Unmittelbar vor der Applikation wurden sie 10 min. bei 95°C inkubiert. Die elektrophoretischen Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur und einer konstanten Spannung von 60 V und dauerten ca. 12 Stunden. Anschließend wurden die Gele mit verschiedenen Methoden angefärbt.

Die Proteinverteilung in Polyacrylamidgelen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Färbungen mit Coomassie Blau (Serva Blau R-250) wurden nach COOPER (1981) durchgeführt. Als Färbe- und Fixierlösung diente eine 0,25

%-ige (w/v) Coomassie-Blau-Lösung in 50 %-igem (v/v) Methanol und 10 %-iger (v/v) Essigsäure, in der Rundgele 12 Stunden, Flachgele 4 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Gele in 7,5 %-iger Essigsäure in 5 %-igem Methanol unter moderater Agitation bei Raumtemperatur entfärbt und im Durchlicht photographiert.

Die zweite Methode, die zum Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen herangezogen wurde, ist die von SWITZER III et al. (1979) eingeführte sogenannte Silberfärbung von Proteinen. Zwar ist die Farbreaktion im einzelnen noch nicht verstanden; im Prinzip handelt es sich jedoch um die Protein-spezifische Reduktion von Ag^{++} -Ionen, vermittelt durch ein organisches Reduktionsmittel (PORRO et al., 1982). Gegenüber der konventionellen Coomassie-Blau-Färbung ist diese Methode etwa 100-fach empfindlicher. Es wurde die modifizierte Prozedur von MORRISSEY (1981) verwendet, die reproduzierbare Färbungsintensitäten und eine gute qualitative Vergleichbarkeit mit Coomassie-Blau-gefärbten Gelen gewährleistet. Sie wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung für "Proteicolor", einer AgNO_3 -Spezialqualität der Firma Roth (Karlsruhe), abgeändert.

Zur Lokalisierung von Katalase-Aktivität in nativen Gelen wurde die Methode von BLAICH (1978) benutzt. Die zylindrischen Gele wurden sukzessiv für je 10 min. in 30 mM H_2O_2 , 0,5 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - und 0,5 % FeCl_3 -Lösung inkubiert. Regionen mit Katalase-Aktivität erscheinen hell vor grünem Hintergrund.

Peroxidase wurde in nativen Gelen nach SCHRAUWEN (1966) nachgewiesen. Die Gele wurden in einer frischen Lösung folgender Zusammensetzung inkubiert: 160 mM Natrium-Acetat, 0,2 mM MnSO_4 , 1,5 mM H_2O_2 , 1,0 % Essigsäure, 0,02 % Benzidin (Merck, Darmstadt) und 0,055 % Guajacol (Sigma,

München). Peroxidase-Aktivität ist an einer dunkelrot-braunen Verfärbung des Gels erkennbar.

Eisenhaltige Proteine wurden mit der Methode von CLARKE (1964) identifiziert. Die Gele wurden in frisch bereiteter 0,2 %-iger Benzidinlösung in 0,5 %-iger Essigsäure und 20 mM H_2O_2 inkubiert. Eisen-Proteine werden hierdurch dunkelblau angefärbt.

III. E R G E B N I S S E

1. Entwicklung von Methoden zur Messung des Berberinbrückenenzyms

Eine zentrale Voraussetzung für den Nachweis des Berberinbrückenenzym's bestand in der Entwicklung eines geeigneten Testsystems. RINK und BÖHM (1975) benutzten in ihrer Untersuchung dieses Enzym's (R,S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin als Substrat, dessen enzymatische Umwandlung sie radiodünnschichtchromatographisch quantifizierten. Sie synthetisierten diese Verbindung mit den kombinierten chemischen Methoden von BATTERSBY et al. (1964) und BARTON et al. (1965b). Die radioaktive Markierung wird in dieser Synthese durch die N-Methylierung von 0,0-Dibenzyl-1,2-dehydronorretikulin mit ¹⁴CH₃J eingeführt. Bedingt durch die anschließend erforderliche Reduktion der 1,2-Doppelbindung erlaubt die Methode nur die Darstellung razemischen Retikulin's.

BATTERSBY et al. beschrieben (1965c) erstmals die Darstellung von optisch reinem, in verschiedenen Positionen markiertem Retikulin. Entsprechend markiertes (R,S)-0,0-Dibenzylretikulin wurde über (-)- bzw. (+)-0,0-Dibenzoyltartrat in seine optischen Antipoden getrennt und anschließend zu (R)- bzw. (S)-Retikulin debenzyliert. Aufgrund der Verwendung markierter Substanzen und den damit verbundenen geringen Substanzmengen konnten die Autoren nur eine optische Reinheit von 96 % erzielen. Das Dilemma ihrer Methode besteht darin, daß eine hohe spezifische Radioaktivität und eine absolute optische Reinheit der markierten Substanzen sich gegenseitig ausschließen. Um optisch reine Verbindungen mit hoher spezifischer Radioaktivität darzustellen, ist es erforderlich, die Razemattrennung vor der Einführung der Markierung durchzuführen. Einen Syntheseweg für (R)- und

(S)-Retikulin, der die Einhaltung dieser Reihenfolge gestattet, berichteten (1980) RICE und BROSSI. Sie stellten Norretikulin in optisch reiner Form dar und setzten die Enantiomere durch N-Formylierung und anschließende Reduktion mit Borhydrid zu (R)- bzw. (S)-Retikulin um.

Das in dieser Arbeit anvisierte Verfahren zur Darstellung spezifisch markierter Retikulinpräparate ging von einer ähnlichen Strategie aus. Optisch reines (R)- und (S)-Norretikulin war nach der Methode von RICE und BROSSI (1980) von Prof. Nagakura synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Die Umsetzung dieser Verbindungen zu (R)- und (S)-Retikulin sollte jedoch nicht auf chemischem Wege, sondern enzymatisch mit Hilfe einer Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase durchgeführt werden. Dieses Enzym war erstmals von WAT et al. (1984) aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert und charakterisiert worden. Es katalysiert die in Abb. 7 dargestellte Reaktion.

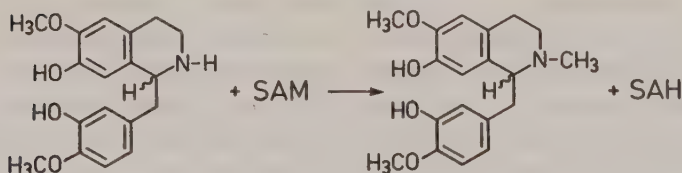


Abb. 7: Reaktion der SAM:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase aus Berberis-Zellkulturen

Da das Enzym keine ausgeprägte Stereoselektivität aufweist (WAT et al., 1984), schien es geeignet für die Darstellung sowohl von (R)- als auch von (S)-Retikulin. Die radioaktive Markierung sollte durch Verwendung von S-Adenosyl-($^{14}\text{CH}_3$)-

bzw. (C^3H_3)-L-Methionin als Cosubstrat in die N-Methylgruppe des Retikulinmoleküls eingeführt werden. Diese Adenosyl-Verbindungen sind zwar kommerziell verfügbar; sie wurden jedoch aus entsprechend markierten L-Methionin-Präparaten, die um den Faktor 7 bis 10 billiger sind (Amersham Buchler, Braunschweig), enzymatisch dargestellt (vgl. II.2.1.1.). (R)- und (S)-($N^{14}CH_3$)-Retikulin sollte in dünnenschichtchromatographischen Analysen enzymkatalysierter Reaktionen als Substrat eingesetzt werden. Die N-Methyl-Tritiummarkierten Retikulinpräparate waren für eine spezifische Erfassung des Berberinbrückenenzym vorgesehen. Wie ein Vergleich von Substrat und Produkt der Reaktion, die das Berberinbrückenenzym katalysiert (RINK und BÖHM, 1975; vgl. Abb. 5), zeigt, bleibt die N-Methylgruppe des Retikulins nicht unversehrt während der Reaktion, sondern wird unter Verlust eines H-Atoms in die Methylengruppe des Scoulerins (die "Berberinbrücke") überführt. Das hier anvisierte Testsystem sah vor, diesen Wasserstoffverlust als Freisetzung von Tritium aus (NC^3H_3)-Retikulin zu bestimmen und zur Quantifizierung der Enzymaktivität zu benutzen.

Im folgenden wird ein abgekürztes Verfahren zur Isolierung und Anreicherung der Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase beschrieben, die zur Darstellung der verschiedenen markierten Substrate verwendet wurde.

1.1. Präparation einer Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase aus Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.-Zellkultur

Die Untersuchungen von WAT et al. (1984) hatten gezeigt, daß von über 50 getesteten Zellsuspensionskulturen Berberis wilsoniae die mit Abstand ergiebigste Quelle zur Gewinnung der Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase ist. Zur Isolierung des Enzyms erwies sich folgende Methode,

die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, als zweckmäßig:

100 g (FG; $\approx$ 4,1 g TG) tiefgefrorenes Zellmaterial wurde in 250 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, und 20 mM β -MSH suspendiert und aufgeschlossen, wie unter II.2.2.3. beschrieben. Der so gewonnene Rohextrakt hatte ein Volumen von 320 ml und war aufgrund seines hohen Gehalts an Jatrorrhizin intensiv gelb gefärbt. Über die Akkumulation dieses Protoberberinalkaloids in Berberis wilsoniae-Zellkulturen berichteten (1981) HINZ und ZENK. Möglicherweise bedingt durch dieses Alkaloid, jedenfalls aber durch eine niedermolekulare Komponente des Rohextraktes sind mit dieser Enzympräparation nur Umsätze von maximal 20 % zu erzielen. Erst nach einer Konzentrierung des Extraktes auf 14 ml durch eine 0-70 %-ige Ammoniumsulfatfällung und anschließender Entsalzung an Sephadex G 25 (Säulenabmessungen: 2,3 cm ϕ x 18 cm Höhe; äquilibriert mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, und 20 mM β -MSH) ist diese Limitierung aufgehoben. Allerdings methyliert das so erhaltene Enzympräparat Norretikulin nicht ausschließlich am Stickstoffatom. Die chromatographische Analyse (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 6; $R_f(\text{SAM}) = 0$) der Inkubationsansätze erwies, daß neben Retikulin ($R_f = 0,65$) ein zweites, nicht identifiziertes radioaktives Nebenprodukt ($R_f = 0,8$) gebildet wird. Seine Syntheserate beträgt etwa 50 % derjenigen des Retikulins; kinetische Untersuchungen zeigten, daß es sich nicht um ein Umsetzungsprodukt des Retikulins handelt. Um diese unerwünschte Nebenreaktion auszuschalten, wurde das Eluat des Gelfiltrationsschrittes durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel weiter fraktioniert. Die chromatographischen Parameter sind in Abb. 8 wiedergegeben. Das vereinigte Eluat mit der höchsten Transmethylierungsaktivität (Volumen: 104 ml) wies keinerlei Störaktivität mehr auf: ($^{14}\text{CH}_3$)-SAM wurde mit (R,S)-Norretikulin aus-

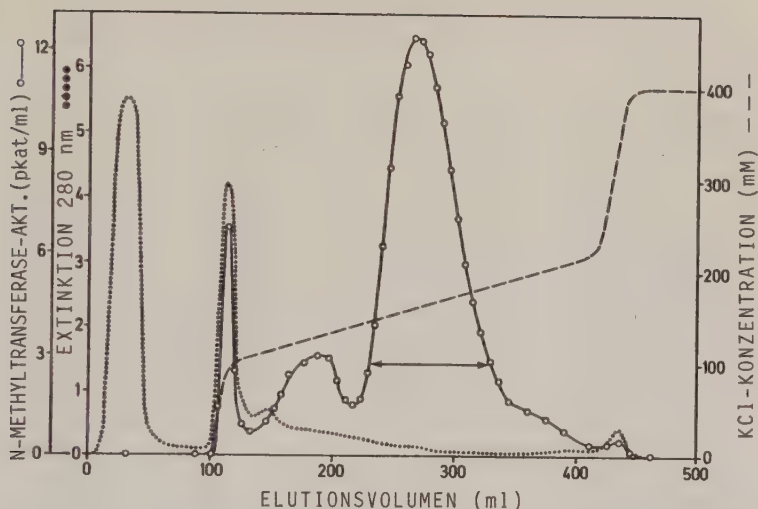


Abb. 8: Fraktionierung eines vorbehandelten Rohextraktes aus *Berberis wilsoniae*-Zellkultur mit SAM:(R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase-Aktivität an DEAE-Sephacel. Säule: 1,6 cm $\varnothing$ x 12,5 cm Höhe, äquilibriert mit 10 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,4, und 20 mM β -MSH. Probe: 167 mg Protein ($\approx$ 7,4 nkat Methyltransferase-Aktivität) in 33 ml Äquilibrierungspuffer. Elutionsgeschwindigkeit: 0,7 ml/min. Aktivitätsbestimmung wie unter II.2.3.1. beschrieben (Extraktionstest). Der Pfeil kennzeichnet das vereinigte Eluat.

schließlich und vollständig zu Retikulin umgesetzt. Derart gereinigte N-Methyltransferase (Anreicherungsfaktor 5,9) wurde für die präparative Darstellung der markierten Retikulinpräparate verwendet. Das Reinigungsverfahren für das Enzym ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Gesamt- Aktivität (pkat)	spez. Aktivität (pkat/mg)	Aus- beute (%)	Anrei- cherung (x-fach)
Rohextrakt	320	267	7820	29,3	100	1
Ammoniumsulfat- fällung (0-70 % Sättigung)	14,5	183	4430	24,2	57	0,83
Gelfiltration (Sephadex G 25)	33,5	167	7400	44,3	95	1,5
Ionenaustausch- chromatographie (DEAE-Sephacel)	104	16,6	2870	173	37	5,9

Tab. 2: Anreicherung der Norretikulin-spezifischen N-Methyltransferase aus Berberis wilsoniae-Zellsuspensionskulturen

1.2. Identifizierung des Enzymprodukts der gereinigten Norretikulin-N-Methyltransferase als Retikulin

Bevor die präparative Darstellung der markierten Substrate für das Berberinbrückenenzym in Angriff genommen werden konnte, mußte zunächst das Produkt, das die angereicherte N-Methyltransferase aus den Substraten Norretikulin und SAM bildet, zweifelsfrei als Retikulin identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde radioaktives Enzymprodukt mit unmarkiertem, authentischem (R,S)-Retikulin versetzt. Sollten die beiden Komponenten dieses Gemisches identisch sein, so dürfte die spezifische Radioaktivität des Ansatzes sich nicht verändern, unabhängig davon, welche Reinigungs- oder Derivatisierungsprozeduren man vollzieht.

Der Versuch wurde im einzelnen folgendermaßen durchgeführt: Ein Ansatz mit etwa 0,7 pkat (4,0 µg Protein) der angereicherten N-Methyltransferase, 0,50 µCi trägerfreiem ($^{14}\text{CH}_3$)-SAM (60 Ci/mol, 10 µCi/ml), 38 nmol (R,S)-Norretikulin-HCl (in 7,5 µl DMSO) und je 14 µmol Na-Ascorbat und Phosphatpuffer, pH 7,4, in einem Gesamtvolumen von 140 µl wurde 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in Laufmittelsystem 6 (vgl. II.2.9.) auf einer Kieselgel-Dünnschichtplatte chromatographiert. Der mit Retikulin korrespondierende Bereich des Chromatogramms ($R_f = 0,6-0,7$) repräsentierte etwa 60 % der Gesamtradioaktivität (SAM ($R_f = 0$): ca. 40 %) und wurde mit Methanol eluiert. Die Radioaktivität des Eluats (Volumen: 2,5 ml) wurde zu 260 nCi bestimmt, entsprechend 52 % der Startradioaktivitätsmenge. 1,50 ml des Eluats wurden mit 7,5 µmol (R,S)-Retikulin-HCl in 1,50 ml Methanol versetzt. Die spezifische Radioaktivität des so verdünnten Präparats betrug 20,8 mCi/mol. Ein Aliquot wurde anschließend acetyliert. 0,35 ml wurden mit N_2 evaporiert und in 1,00 ml eines Essigsäure-Pyridin-Gemisches (1/1, v/v) 2,5 Stunden bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Essigsäureanhydrid mit 0,2 ml H_2O hydrolisiert und der Ansatz mit Äther erschöpfend extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gründlich evaporiert, der gelbliche Rückstand in 70 μ l Methanol aufgenommen. 100 μ l-Aliquots des unbehandelten und 20 μ l-Aliquots des acetylierten Ansatzes wurden in den Laufmittelsystemen 7-9 (vgl. II.2.9.) chromatographiert. In allen Systemen wiesen die Chromatogramme nur ein Radioaktivitätsmaximum auf; der radioaktive Bereich korrespondierte mit demjenigen der Fluoreszenzlöschung. Diese Zonen wurden mit Methanol eluiert, evaporiert und in je 2,0 ml Äthanol aufgenommen. UV-Absorption und Radioaktivitätsgehalt der Eluate wurde gemessen; die spezifische Radioaktivität der unbehandelten Proben wurde über den Extinktionskoeffizienten (ϵ_{285}^{EtOH} (Retikulin) = $6,76 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mmol}$) (SHAMMA, 1972) berechnet; für die acetylierten Präparate wurden ihre relativen spezifischen Aktivitäten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Der Wert der spezifischen Radioaktivität des Gemisches aus Enzymprodukt und authentischem (R,S)-Retikulin blieb nach Rechromatographie in drei verschiedenen Laufmittelsystemen konstant. Ein im wesentlichen entsprechendes Ergebnis zeigte die chromatographische Analyse des acetylierten Derivates. Damit war das Enzymprodukt der (R,S)-Norretikulin-N-Methyltransferase eindeutig als Retikulin identifiziert worden.

1.3. Darstellung von (R)- und (S)-($N^{14}CH_3$)- bzw. -(NC^3H_3)-Retikulin

Vorversuche zur Darstellung der markierten Substrate für das Berberinbrückenenzym sollten die Frage klären, ob es zu diesem Zweck erforderlich ist, das Cosubstrat SAM in gereinigter Form einzusetzen. Dazu wurden 5 bzw. 10 μ l-Ali-

Laufmittel- system	unbehandelter Ansatz		acetylierter Ansatz	
	Rf-Wert	spez. Akt. mCi/mol	Rf-Wert	spez. Akt. nCi/E ₂₈₀
7	0,40	23,2	0,80	9,31
8	0,45	23,3	0,75	12,2
9	0,15	22,3	0,75	10,7

Tab. 3: Spezifische Radioaktivität eines Gemisches aus markiertem N-Methyltransferase-Produkt und authentischem (R,S)-Retikulin vor bzw. nach Acetylierung und Rechromatographie in verschiedenen Laufmittelsystemen

quots der ungereinigten Ansätze A und B, mit denen zuvor $^{14}\text{CH}_3$ - bzw. C^3H_3 -SAM präparativ synthetisiert worden war (vgl. II.2.1.1.), mit 17 nmol unmarkiertem SAM, 170 nmol (R,S)-Norretikulin, je 20 μmol Na-Ascorbat und Phosphatpuffer, pH 7,4, sowie 5 pkat N-Methyltransferase inkubiert. Die dünnschichtchromatographische Analyse der Ansätze (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 6; $\text{Rf}(\text{SAM}) = 0$, $\text{Rf}(\text{Retikulin}) = 0,65$) zeigte keinerlei Unterschied zu der Radioaktivitätsverteilung von Kontrollansätzen, die authentisches ^{14}C -SAM als Cosubstrat enthielten. In allen Fällen wurde eine vollständige Umsetzung zu Retikulin erzielt; eine Interferenz der bakteriellen Proteine wurde nicht beobachtet. Dieser Befund zeigte, daß sich eine - sicherlich verlustbehaftete - Reinigung des markierten Zwischenproduktes SAM erübrigte: die S-Methylgruppe des Methionins kann durch die aufeinanderfolgende Katalyse der SAM-Synthetase und der Norretikulin-N-Methyltransferase direkt auf das Stickstoffatom des Retikulins übertragen werden. Weitere Versuche, bei denen nicht-gereinigtes SAM als radioakti-

ves Substrat eingesetzt wurde, dienten der Ermittlung eines günstigen Enzym-Substrat-Verhältnisses und eines geeigneten Überschusses an unmarkiertem Cosubstrat. Unter Berücksichtigung der Resultate dieser Experimente wurde die präparative Synthese der einzelnen Retikulinpräparate in folgenden Inkubationsansätzen durchgeführt:

Ansatz	A	B	C	D
ungereinigtes ($^{14}\text{CH}_3$)-SAM	2,1 μmol 125 μCi	2,1 μmol 125 μCi	---	---
ungereinigtes (C^3H_3)-SAM	---	---	57 nmol 5 mCi	57 nmol 5 mCi
Na-Ascorbat	5 mmol	5 mmol	5 mmol	5 mmol
(R)-Norretikulin-HCl	20 μmol	---	1 μmol	---
(S)-Norretikulin-HCl	---	20 μmol	---	0,5 μmol
Methyltransferase	550 pkat	550 pkat	930 pkat	550 pkat
Gesamtvolumen	28 ml	28 ml	42 ml	28 ml

"Ungereinigtes SAM" steht für die Präparate des Kapitels II.2.1.1., die halbiert und auf je zwei Ansätze verteilt wurden. Die für SAM angegebenen Molzahlen wurden nicht gemessen, sondern aus der spezifischen Radioaktivität des Methionins berechnet. Norretikulin war in DMSO gelöst; die DMSO-Endkonzentration betrug in allen Ansätzen weniger als 0,4 % (v/v). Die N-Methyltransferase war 6-fach angereichert (vgl. III.1.1.). Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Der Reak-

tionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch (vgl. II. 2.9.; Laufmittelsystem 6) verfolgt (Abb. 9). Während die Ansätze A, B und D eine zufriedenstellende Umsatzrate zeigten, erfolgte die Methylierung von (R)-Norretikulin mit (C^3H_3)-SAM mit deutlich geringerer Geschwindigkeit. Außerdem erreichte die Reaktion bereits nach etwa 50 %iger Umsetzung ihren Endpunkt (Ansätze A, B und D: 85-90 %); durch nochmalige Zugabe von (R)-Norretikulin und N-Methyltransferase konnte nach 50-stündiger Inkubation ein ca. 65 %iger

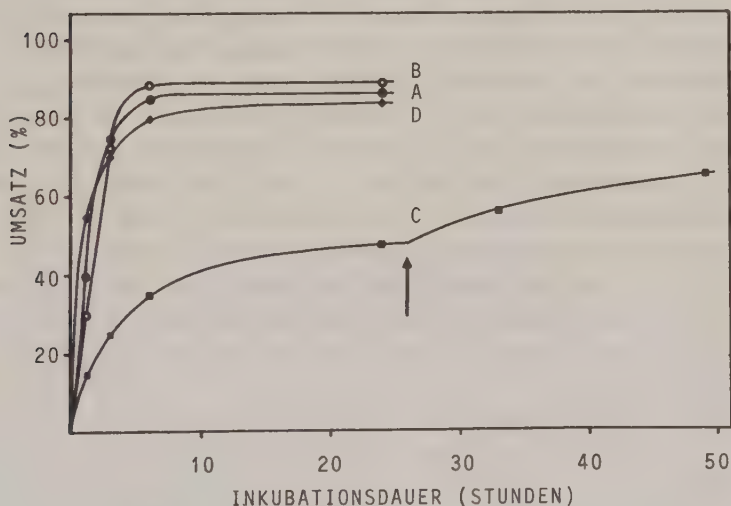


Abb. 9: Kinetik der Produktbildung in Ansätzen zur präparativen Darstellung von A: (R)-($N^{14}CH_3$)-, B: (S)-($N^{14}CH_3$)-, C: (R)-(NC^3H_3)-, D: (S)-(NC^3H_3)-Retikulin. Ansatz C wurde nach 26-stündiger Inkubation mit 0,5 μ mol (R)-Norretikulin-HCl und 380 pkat Norretikulin-N-Methyltransferase versetzt, um den Grad der Umsetzung zu erhöhen (Pfeil).

Umsatz erzielt werden. Eine bevorzugte Umsetzung des (S)-Enantiomers von Norretikulin durch die N-Methyltransferase hatten schon WAT *et al.* (1984) beobachtet. Wie der Vergleich der Ansätze A und B einerseits und C und D andererseits zeigt, macht sich der Unterschied in der Umsetzungsrate besonders bei niedriger Substratkonzentration (hier: 18 μ M Norretikulin, 2 μ M SAM) bemerkbar. Die Ansätze wurden tiefgefroren aufbewahrt. Die markierten Retikulinpräparate wurden aus 1/10-Aliquots der Gesamtansätze mit folgender Methode isoliert:

Je 3,0 ml (Ansatz C: 6,0 ml) wurden mit je 1,0 ml (C: 2,0 ml) 1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,5, versetzt und mit Essigsäureäthylester erschöpfend extrahiert. Der Rückstand der evaporierten organischen Phasen wurde in Methanol aufgenommen und in Laufmittelsystem 7 (vgl. II.2.9.; R_f (Retikulin)= 0,40; R_f (Norretikulin)= 0,25; R_f (SAM)= 0) chromatographiert. Der radioaktive, mit Retikulin korrespondierende Bereich der Chromatogramme wurde mit Methanol eluiert, das Eluat evaporiert, der Rückstand in je 1,0 ml H_2O aufgenommen und seine Radioaktivität bestimmt. Bezogen auf die Radioaktivitätsmenge des eingesetzten Methionins wurden folgende Gesamtausbeuten an gereinigtem Retikulin erzielt:

Ansatz	A	B	C	D
Stereokonfiguration	R	S	R	S
Markierung	($N^{14}CH_3$)	($N^{14}CH_3$)	(NC^3H_3)	(NC^3H_3)
Ausbeute	43 %	53 %	23 %	44 %

Die spezifischen Aktivitäten der ^{14}C -markierten Präparate wurden zu 44 (A) bzw. 46 (B) Ci/mol bestimmt. Mehrfach ^{14}C -markierte (R)- und (S)-Retikulinpräparate von BATTERSBY

et al. (1965c) besaßen eine spezifische Aktivität von 0,75 Ci/mol. Die spezifische Radioaktivität der tritiierten Moleküle wurde mit stereospezifischen Radioimmuntests (WIECZOREK et al., in Vorbereitung) nach der "self-displacement" Methode (CHERVU und MURTY, 1975) bestimmt. Für die Messung danke ich Frau Wieczorek. Der Wert für (R)-Retikulin betrug 3,2 Ci/mmol, für (S)-Retikulin 7,2 Ci/mmol: Diese Werte liegen um mehr als drei Zehnerpotenzen über denjenigen, die BATTERSBY et al. (1965 c) für C1-tritiiertes (R)- bzw. (S)-Retikulin berichteten. Gegenüber optisch reinem, N-Methyltritiiertem Retikulin (BATTERSBY et al., 1975) besitzen die Präparate eine 110- bzw. 240-fach höhere spezifische Radioaktivität. Sie gestatten damit einen wesentlich empfindlicheren Nachweis stereospezifischer Metabolisierungen von (R)- und (S)-Retikulin. Andererseits weisen sie gegenüber der radioaktiven Ausgangssubstanz ($S-C^3H_3$)-L-Methionin eine erheblich verringerte spezifische Radioaktivität auf: (R)-Retikulin um den Faktor 27,5, (S)-Retikulin um den Faktor 12,2. Diese Erniedrigung ergibt sich aus der Verdünnung der radioaktiven Verbindungen Methionin, SAM oder Retikulin durch die entsprechenden unmarkierten Substanzen in den Syntheseansätzen. Durch die hohe spezifische Radioaktivität des L-Methionins - der Wert von 88 Ci/mmol entspricht etwa dem theoretischen Maximalwert (Amersham Buchler; Braunschweig)- genügen schon geringe Mengen einer oder einer Kombination der drei genannten Verbindungen, um die Erniedrigung der spezifischen Aktivität zu erklären: 1,0 μ mol bei Ansatz C und 0,54 μ mol bei Ansatz D. Für den Unterschied in den spezifischen Radioaktivitäten der enantiomeren Retikulinpräparate kann nur unmarkiertes Retikulin verantwortlich gemacht werden, daß mit dem N-Methyltransferasepräparat in die Syntheseansätze eingetragen wurde. Die 2,3-fach niedrigere spezifische Aktivität, die das (R)-(NC^3H_3)-Retikulin gegenüber dem (S)-Enantiomer aufweist,

erklärt sich plausibel durch den Umstand, daß für seine Synthese die etwa 1,7-fache Menge an N-Methyltransferase verwendet wurde.

Aus diesen Darlegungen ergibt sich, daß die einzelnen Retikulin-Präparationen nur hinsichtlich der radioaktiven Molekülspezies eine vollständige optische Reinheit aufweisen. Diese Eigenschaft ist jedoch auch die entscheidende für die konzipierten Testsysteme, deren Detektionsmethode eben auf dem radioaktiven Charakter der Substrate beruht (vgl. III.1.4., III.1.5.). Außerdem wurden die markierten Substrate derart mit authentischem Retikulin von absoluter optischer Reinheit verdünnt, daß der Anteil von optisch undefiniertem Retikulin nur etwa 2 % betrug.

1.4. Messung des enzymkatalysierten Tritium-Ausbaus aus (NC³H₃)-Retikulin (Tritium-Ausbaustest)

Wie schon erwähnt (III.1.) sollte nach unserer Konzeption das Berberinbrückenenzym anhand seiner katalytischen Fähigkeit nachgewiesen werden, Tritium aus der N-Methylgruppe von (NC³H₃)-Retikulin freizusetzen. Es war vorgesehen, dieses freigesetzte Tritiumatom im Medium der Testansätze zu bestimmen, nachdem die markierten Alkaloide durch Adsorption an Aktivkohle aus den Ansätzen entfernt worden waren. Dieses Testsystem leitet sich in methodischer Hinsicht von denen für die Strictosidin-Synthase (TREIMER und ZENK, 1979; PFITZNER und ZENK, 1982) und für die (S)-Norlaudanosolin-Synthase (RÜFFER et al., 1981) ab. In seiner optimierten Form hatte es folgende Zusammensetzung (Standard-Testverfahren): Bis zu 0,1 mg Protein (in 50 µl 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4), 25 µmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, und 255 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (180 Ci/mol) in einem Gesamtvolumen von 0,25 ml wurden 60 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Testansätze mit 0,30 ml

einer neutralisierten Aktivkohlesuspension (4 g/100 ml H_2O) versetzt und 1 min. intensiv geschüttelt. Die Kohle wurde sedimentiert durch Zentrifugation (Eppendorf-System) und die Radioaktivität eines 350 μ l-Aliquots des Überstandes bestimmt. Kontrollansätze enthielten Hitze-denaturiertes Protein; Ansätze zur Bestimmung der maximal erreichbaren Radioaktivität wurden mit H_2O anstelle der Kohlesuspension versetzt. 33% dieser Radioaktivitätsmenge im Überstand von Testansätzen, entsprechend dem Ausbau eines von drei Tritiumatomen, wurden als vollständige Umsetzung der eingesetzten Substratmenge von 255 pmol angesehen. Enzymaktivitätsbestimmungen wurden durch die Messung des Umsatzes in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge ermittelt, wobei zur Berechnung die linearen Kurvenabschnitte herangezogen wurden (vgl. Abb. 16). Von diesem Standardverfahren abweichende Messungen sind jeweils an den entsprechenden Stellen spezifiziert.

Das Testprinzip, das diesem neuartigen Verfahren zur Messung des Berberinbrückenenzym zugrunde liegt, hat seine Funktionsfähigkeit auf Anhieb bewiesen (vgl. III.2.). Seine Vorteile gegenüber der chromatographischen Methode von RINK und BÖHM (1975) liegen in der Schnelligkeit der Analyse, in seiner einfachen Handhabung, die gut reproduzierbare Meßergebnisse gewährleistet, in seiner überlegenen Empfindlichkeit und schließlich in seinem stereospezifischen Charakter. Die Nachweisgrenze des Standardtests liegt mit weniger als 0,05 fkat um etwa 3 Zehnerpotenzen unter derjenigen des von RINK und BÖHM (1975) benutzten Verfahrens. Die registrierten Meßergebnisse erwiesen sich als enzymkatalysiert; unspezifische Effekte überschritten typischerweise nicht 2 % des theoretisch erreichbaren Maximalwertes.

Die Methode hat allerdings auch gewisse Nachteile. Sie sind im folgenden Kapitel sowie unter III.5.1. und

III.6.2. genannt.

Die spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Substrate, die im Tritium-Ausbaute test wie in den chromatographischen Verfahren (III.1.5.) Verwendung fanden, wurden durch Verdünnung mit optisch reinem, unmarkiertem (R)- bzw. (S)-Retikulin auf den gewünschten Wert eingestellt. Dadurch war es möglich, die Empfindlichkeit der Testsysteme praktisch beliebig zu variieren. Die verwendeten unmarkierten, optisch reinen Retikulinpräparate waren nach der Methode von RICE und BROSSI (1980) von Prof. Nagakura synthetisiert und mir dankenswerterweise zur Verfügung gestellt worden.

1.5. Chromatographischer Nachweis des Berberinbrücken- enzym s

Ein Nachteil des Tritium-Ausbaute tests besteht darin, daß das Reaktionsprodukt Scoulerin nicht analysiert und identifiziert werden kann. Für diesen Zweck waren, besonders zu Beginn der Untersuchungen, chromatographische Testverfahren unverzichtbar. Im Vergleich zum Tritium-Ausbaute test bieten sie eine überlegene Aussagekraft, da sie zwischen verschiedenen Enzymaktivitäten differenzieren können, und sind flexibler, da auch Reaktionen ohne Tritium-Ausbau erfaßt werden können. In derartigen Analysen fanden die ^{14}C -markierten Retikulinpräparate Verwendung. Hierdurch wurde eine quantitative Auswertung der dünn schicht chromatographisch gewonnenen Ergebnisse ermöglicht. Die Testzusammensetzungen variierten, abhängig von den interessierenden Problemstellungen, und sind im jeweiligen Zusammenhang genannt.

2. Taxonomische Verbreitung und Stereoselektivität des Berberinbrückenenzym

Die erste Problemstellung, die nach der Darstellung der verschieden markierten Substratmoleküle für das Berberinbrückenenzym in Angriff genommen werden konnte, war der Nachweis des Enzyms in Pflanzenmaterial unterschiedlicher Herkunft. Eine Korrelation zwischen der taxonomischen Verbreitung des Enzyms einerseits und jener der Protoberberinalkaloide andererseits wäre ein wichtiger Hinweis für die biosynthetische Signifikanz der gemessenen Enzymaktivität. Zur Beantwortung dieser Fragestellung hatten BÖHM und RINK (1975) zellfreie Proteinextrakte untersucht, die sie aus Blättern zehn verschiedener Pflanzen isolierten. In der vorliegenden Arbeit wurden neben differenzierten Pflanzen auch unterschiedliche Zellsuspensionskulturen getestet, größtenteils von Pflanzen, für die der Gehalt an Protoberberinalkaloiden charakteristisch ist. Dies geschah auch in Hinblick darauf, ein geeignetes Untersuchungsobjekt zu finden, aus dem sich das Berberinbrückenenzym in möglichst hoher Ausbeute gewinnen läßt.

Proteinextrakte aus differenzierten Pflanzen bzw. Pflanzenteilen, die wie unter II.2.2.2. beschrieben hergestellt wurden, wurden im Standard-Tritium-Ausbaute test gemessen (vgl. III.1.4.). Die Resultate faßt Tab. 4 zusammen.

Tab. 4: Berberinbrückenenzym-Aktivität in Rohextrakten aus differenzierten Pflanzen. Der Nachweis erfolgte im Standard-Tritium-Ausbaute test (vgl. III.1.4.). Die mit *1 gekennzeichneten Pflanzen wurden auch als Zellkultur getestet (vgl. Tab. 5 und 6), die mit *2 bezeichneten Pflanzen wurden schon von BÖHM und RINK (1975) untersucht. F= Freiland, G= Gewächshaus.

Pflanze	verwendete Pflanzenteile	Anzucht	Enzymaktivität
			pkat/mg Protein g TG
Anonaceae			
Anona reticulata L.	Sproß und Blätter	G	0 0
Berberidaceae			
Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid. *1	Sproß und Blätter	F	0 0
Ranunculaceae			
Aquilegia alpina L. *1	Sproß und Blätter	F	0 0
Menispermaceae			
Chasmanthera dependens Hochst.	Sproß und Blätter	G	0 0
Cissampelos mucronata R. Rich. *1	Sproß und Blätter	G	0 0
Cocculus trilobus (Thunb.)DC.	ganze Pflanze	G	0 0
Menispermum dauricum DC.	Sproß und Blätter	G	0 0
Stephania glabra Miers	Sproß und Blätter	G	0 0
Papaveraceae			
Chelidonium franchetianum Prain.	Blätter	F	0 0
Chelidonium majus L. *1,*2	Sproß und Blätter	F	0,40 19
Eschscholtzia californica Cham. *1	Sproß und Blätter	G	0,074 2,4
Eschscholtzia lobbii Greene *1	Sproß und Blätter	F	0,75 14

Fortsetzung Tab. 4

Pflanze	verwendete Pflanzenteile	Anzucht	Enzymaktivität	
			pkat/mg Protein	pkat/g TG
Papaveraceae				
Papaver caucasicum Bieb.	Sproß und Blätter	F	0	0
Papaver fugax Poir.	Sproß und Blätter	F	0,085	1,5
Papaver somniferum L. *1,*2	Sproß und Blätter	F	0,053	2,9
Papaver somniferum L. *1,*2	Wurzeln	F	2,6	103
Fumariaceae				
Dicentra spectabilis (L.)Lem. *1	ganze Pflanze	F	0,19	2,5
Fumaria parviflora Lam.	Sproß und Blätter	F	0,45	8,7
Nelumbonaceae				
Nelumbo nucifera Gaerth.	Sproß und Blätter	G	0	0
Kontrollen				
Solanaceae				
Nicotiana tabacum L. *1	Sproß und Blätter	G	0	0
Apocynaceae				
Catharanthus roseus (L.)G. Don. *1	Sproß und Blätter	G	0	0

Zur Gewinnung von Enzympräparationen aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen, die eine Woche lang unter den in Kapitel II.1.1.3. beschriebenen Bedingungen kultiviert worden waren, wurde Zellmaterial in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, und 20 mM β -MSH (2 ml/g FG) aufgeschlossen. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter II.2.2.3. angegeben. Für die Bereitstellung der Enzymextrakte, die auch für die Suche nach einem anderen Enzym verwendet wurden, danke ich Frau Dr. Rüffer. Die katalytische Aktivität der zellfreien Extrakte wurde sowohl im Tritium-Ausbaute test als auch in einem zweidimensionalen chromatographischen Testverfahren untersucht. Bei beiden Methoden wurden die jeweiligen Substrate nach Enantiomeren getrennt eingesetzt. Abweichend von den erst später etablierten Standard-Bedingungen enthielten die Inkubationsansätze des Tritium-Ausbaute tests in einem Volumen von 0,1 ml 4 μ mol Triäthanolamin/HCl-Puffer, pH 8,4, 0,4 μ mol Na-Ascorbat, 2 nmol (R)- bzw. (S)-(NC³H₃)-Retikulin-HCl (spez. Akt.: 33 Ci/mol) und bis zu 500 μ g Protein in 80 μ l 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, und 20 mM β -MSH. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze nach der unter III.1.4. beschriebenen Methode analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Das chromatographische Testverfahren diente dazu, einen Überblick qualitativer Art darüber zu gewinnen, welche Metabolisierungsmöglichkeiten, ausgehend von (R)- bzw. (S)-Retikulin, in den einzelnen Zellkulturen realisiert sind. Die Inkubationsansätze (Volumen: 70 μ l) enthielten 1,3 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,8, 0,4 μ mol Na-Ascorbat, 1,2 nmol (R)- bzw. (S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin (spez. Akt.: 44 bzw. 46 Ci/mol) und bis zu 300 μ g Protein in 50 μ l 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, und 20 mM β -MSH. Einige Ansätze enthielten zusätzlich 3,4 nmol SAM, um ein eventuelles Potential der Enzymextrakte zu demonstrieren, Retikulin zu methylierten Derivaten umzusetzen. Nach 2-stündiger Inkuba-

Zellkultur	Medium	pkat/mg Protein	pkat/l Kultur
Berberidaceae			
<i>Berberis beaniana</i> Schneid.	LS	3,0	320
<i>Berberis vulgaris</i> L.	LS	1,3	250
<i>Berberis stolonifera</i> Koehne & Wolf	LS	0,49	230
<i>Berberis wilsoniae</i> var. <i>subcaulialata</i> Schneid.	LS	1,9	210
<i>Berberis henryana</i> Schneid.	LS	4,0	210
<i>Berberis turcomanica</i> Karel	LS	1,3	110
<i>Berberis heteropoda</i> Schrenk.	LS	0,61	84
<i>Berberis regeliana</i> Koehne	LS	1,7	63
<i>Berberis julianae</i> Schneid.	LS	1,3	54
<i>Berberis valdisepala</i>	LS	0,27	52
<i>Berberis canadensis</i> Mill.(Pursh.)	LS	0,28	47
<i>Berberis gagnepainii</i> Schneid.	LS	0,52	38
<i>Berberis notabilis</i> Schneid.	LS	0,26	24
<i>Berberis verna</i> Schneid.	LS	0,40	22
<i>Berberis thibetica</i> Schneid.	LS	0,12	18
<i>Berberis aristata</i> DC.	LS	0,46	12
<i>Berberis papillifera</i>	LS	0,24	10
<i>Berberis amurensis</i> Rupr.	LS	0,25	5,8
<i>Berberis paravirescens</i>	LS	0,085	5,5
<i>Berberis circumserrata</i> Schneid.	LS	0,12	5,1
<i>Berberis dictyophylla</i> Franch.	LS	0,082	3,0
<i>Podophyllum versipelle</i> Hance.	LS	0,052	2,1
<i>Podophyllum emodi</i> Wall.	LS	0	0
Ranunculaceae			
<i>Thalictrum squarrosum</i> Steph.	LS	4,1	240
<i>Thalictrum glaucum</i> Desf.	LS	0,11	210
<i>Thalictrum sparsiflorum</i> Turcz.	LS	0,75	180
<i>Thalictrum dipterocarpum</i> Franch.	LS	0,37	90
<i>Thalictrum dasycarpum</i> Fisch. et Lall.	LS	1,3	67

Fortsetzung Tab. 5

Zellkultur	Medium	pkat/mg Protein	pkat/l Kultur
Ranunculaceae			
<i>Thalictrum calabricum</i> Spreng.	LS	0,53	31
<i>Thalictrum minus</i> L.	LS	0,34	23
<i>Thalictrum coerulum</i>	4x	0,35	16
<i>Thalictrum tuberosum</i> L.	LS	0,19	12
<i>Thalictrum simplex</i> ssp. <i>galioides</i> (Nestl.) Borza	4x	0,062	5,7
<i>Thalictrum alpinum</i> L.	LS	0,053	3,0
<i>Aquilegia alpina</i> L.	LS	0,045	1,9
<i>Ranunculus acer</i> L.	4x	0	0
<i>Ranunculus carpaticus</i>	LS	0	0
<i>Ranunculus flammula</i> L.	LS	0	0
Menispermaceae			
<i>Cissampelos mucronata</i> R. Rich.	4x	1,4	370
Papaveraceae			
<i>Glaucium flavum</i> Crantz.	LS	2,6	240
<i>Glaucium rubrum</i> Sibth et Sm.	LS	3,1	190
<i>Bocconia cordata</i> Will.	4x	1,1	86
<i>Eschscholtzia tenuifolia</i> Hook f.	LS	0,16	68
<i>Eschscholtzia lobbii</i> Greene	LS	0,63	46
<i>Argemone platyceras</i> Link et Otto	LS	0,075	35
<i>Papaver somniferum</i> L.	LS	0,30	32
<i>Eschscholtzia californica</i> Cham.	LS	0,16	29
<i>Meconopsis robusta</i> Hook	LS	0,34	26
<i>Argemone intermedia</i> Sweet	LS	0,31	13
<i>Chelidonium majus</i> L.	LS	0,095	13
<i>Glaucium corniculatum</i> (L.)Curt.	LS	0,16	2,7
<i>Glaucium vitellinum</i> hort.non Boiss. et Buhse	LS	0,72	2,4
<i>Hypecoum leptocarpum</i> Hooker et Thompson	LS	0,041	1,3
<i>Roemeria rheadiflora</i> Boiss.	LS	0	0

Fortsetzung Tab. 5

Zellkultur	Medium	pkat/mg Protein	pkat/l Kultur
Fumariaceae			
<i>Fumaria capreolata</i> L.	LS	0,79	240
<i>Adlumia fungosa</i> (Ait.)Greene	LS	1,6	180
<i>Corydalis vaginans</i> Royle	LS	5,3	91
<i>Fumaria officinalis</i> L.	LS	0,40	71
<i>Corydalis aurea</i> Willd.	LS	0,14	37
<i>Dicentra spectabilis</i> (L.)Lem.	LS	0,20	21
<i>Corydalis ophiocarpa</i> Hook. f. et Thoms.	LS	0,090	4,1
<i>Fumaria muralis</i> Sond. ex Koch	4x	0,041	2,4
Aristolochiaceae			
<i>Aristolochia maxima</i> L.	B5CM	0	0
<i>Aristolochia clematitis</i> L.	LS	0	0
Rutaceae			
<i>Ruta chalepensis</i> L.	4x	0	0
Kontrollen:			
Apocynaceae			
<i>Catharanthus roseus</i> (L.)G.Don.	LS	0	0
Solanaceae			
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	4x	0	0

Tab. 5: Vorkommen des Berberinbrückenenzym in 67 Zellsuspensionskulturen von Pflanzen aus 9 verschiedenen Familien. Die Aktivität wurde mit Hilfe des Tritium-Ausbauteests bestimmt, wie unter III.2. beschrieben.

tion bei 30°C wurden 20 µl-Aliquots der Testansätze zweidimensional chromatographiert (vgl. II.2.9.; 1. Dimension: Laufmittelsystem 5; R_f (Retikulin) = 0,65; 2. Dimension: Laufmittelsystem 6; R_f (Retikulin) = 0,6-0,7) und die Chromatogramme, wie in Kapitel II.2.8. beschrieben, autoradiographisch ausgewertet. Die Ergebnisse der visuellen Auswertung der Autoradiogramme zeigt Tab. 6; eine Auswahl der Autoradiogramme ist in Abb. 10 dargestellt.

Bei der Untersuchung von Zellsuspensionskulturen aus 7 verschiedenen Pflanzenfamilien, in denen das Vorkommen von Protoberberinalkaloiden beschrieben ist (vgl. Abb. 2), zeigte sich, daß in 57 von 65 getesteten Kulturen die Aktivität des Berberinbrückenenzym mit Hilfe des Tritium-Ausbauteests eindeutig nachweisbar war. In zwei als Kontrollen getesteten Kulturextrakten von Catharanthus roseus und Nicotiana tabacum war dagegen keinerlei Berberinbrückenenzym-Aktivität zu finden. Diese Befunde dokumentieren eine ausgeprägte Korrelation zwischen der taxonomischen Verbreitung der hier registrierten Enzymaktivität und des Vorkommens der Protoberberinalkaloide. Sie suggerieren, daß die gemessene Aktivität ursächlich ist für die Biosynthese dieser Alkaloide. Eine entsprechende Vermutung, zu der BÖHM und RINK (1975) aufgrund ihrer Untersuchung zur Verbreitung des Berberinbrückenenzym gekommen waren, ist damit bestätigt und zusätzlich experimentell fundiert worden.

Das eindeutigste Ergebnis der hier berichteten Reihenuntersuchung ist aber, daß das Berberinbrückenenzym eine absolute Stereoselektivität besitzt, unabhängig davon, aus welcher Kultur es isoliert wurde: ausnahmslos wurde ausschließlich das (S)-Enantiomer von Retikulin metabolisiert. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Tritium-Ausbauteests stehen die (qualitativen) Resultate der chromatographischen Untersuchung. In der Mehrzahl der Fälle wurde (S)-Retikulin zu einem oder mehreren Produkten meta-

Zellkultur	Grad der Metabolisierung		Anzahl der Hauptprodukte	
	in %		(davon stereospezifisch gebildet)	
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM	mit SAM
	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.
Berberidaceae				
Berberis beaniana Schneid.	0	100	0	100
Berberis vulgaris L.	0	100	-	-
Berberis stolonifera Koehne & Wolf	0	100	5	100
Berberis wilsoniae var. subcaulialata Schneid.	0	100	0	100
Berberis henryana Schneid.	0	95	0	90
Berberis turcomanica Karel	0	100	-	-
Berberis heteropoda Schrenk.	0	100	-	-
Berberis regaliana Koehne	0	100	-	-
Berberis julianae Schneid.	0	100	-	-
Berberis valdissepala	0	40	-	-
Berberis canadensis Mill. (Pursh.)	0	15	-	-
Berberis gagnepainii Schneid.	0	70	-	-
Berberis notabilis Schneid.	0	35	-	-

Fortsetzung Tab. 6

Zellkultur

	Grad der Metabolisierung		Anzahl der Hauptprodukte	
	in %	(davon stereospezifisch gebildet)		
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM	mit SAM
	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.
Berberidaceae				
<i>Berberis verna</i> Schneid.	0	60	-	-
<i>Berberis thibetica</i> Schneid.	0	0	-	-
<i>Berberis aristata</i> DC.	0	30	-	-
<i>Berberis papillifera</i>	0	20	-	-
<i>Berberis amurensis</i> Rupr.	0	5	-	-
<i>Berberis paravirens</i>	0	5	-	-
<i>Berberis circumserrata</i>	0	5	-	-
Schneid.				
<i>Berberis dictyophylla</i>	0	5	-	-
Franch.				
<i>Podophyllum versipelle</i>	0	0	0	0
Hance.				
<i>Podophyllum emodi</i> Wall.	0	0	-	-

Fortsetzung Tab. 6

Zellkultur	Grad der Metabolisierung in %		Anzahl der Hauptprodukte (davon stereospezifisch gebildet)	
	ohne SAM (R)-Ret. (S)-Ret.	mit SAM (R)-Ret. (S)-Ret.	ohne SAM (R)-Ret. (S)-Ret.	mit SAM (R)-Ret. (S)-Ret.
Ranunculaceae				
<i>Thalictrum squarrosum</i> Steph.	0	100	-	4(4)
<i>Thalictrum glaucum</i> Desf.	0	5	-	1(1)
<i>Thalictrum sparsiflorum</i> Turcz.	0	100	-	4(4)
<i>Thalictrum dipterocarpum</i> Franch.	0	100	-	1(1)
<i>Thalictrum dasycarpum</i> Fisch. et Lall.	0	95	0	3(3)
<i>Thalictrum calabricum</i> Spreng.	0	95	-	2(2)
<i>Thalictrum minus</i> L.	0	100	-	5(5)
<i>Thalictrum coeruleum</i>	0	15	-	2(2)
<i>Thalictrum tuberosum</i> L.	0	40	-	2(2)
<i>Thalictrum simplex</i> ssp. galloides (Nestl.) Borza	0	15	-	5(5)
<i>Thalictrum alpinum</i> L.	0	10	-	1(1)
<i>Aquilegia alpina</i> L.	0	5	0	2(2)

Zellkultur	Grad der Metabolisierung		Anzahl der Hauptprodukte	
	in %	(davons stereospezifisch gebildet)		
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM	mit SAM
	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.
Ranunculaceae				
Ranunculus acer L.	0	0	0(0)	0(0)
Ranunculus carpaticus	0	-	0(0)	-
Ranunculus flammula L.	0	-	0(0)	-
Menispermaceae				
Cissampelos mucronata R. Rich.	0	100	0(0)	4(4)
Papaveraceae				
Glaucium flavum Crantz.	0	100	0(0)	1(1)
Glaucium rubrum Sibth et Sm.	0	-	0(0)	-
Bocconia cordata Will.	0	100	0(0)	2(2)
Eschscholtzia tenuifolia Hook f.	0	20	0(0)	1(1)
Eschscholtzia lobbliei Greene	0	100	0(0)	2(2)
Argemone platyceras Link et Otto	0	35	0(0)	1(1)
Papaver somniferum L.	0	20	0(0)	1(1)

Fortsetzung Tab. 6

Zellkultur

Zellkultur	Grad der Metabolisierung in %		Anzahl der Hauptprodukte (davon stereospezifisch gebildet)					
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM		mit SAM			
	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.		
Papaveraceae								
Eschscholtzia californica Cham.	0	90	-	-	0(0)	4(4)	-	-
Meconopsis robusta Hook	0	95	0	95	0(0)	3(3)	0(0)	3(3)
Argemone intermedia Sweet	0	20	-	-	0(0)	2(2)	-	-
Chelidonium majus L.	0	20	15	15	0(0)	1(1)	1(1)	1(1)
Glaucium corniculatum (L.)Curt.	0	20	-	-	0(0)	1(1)	-	-
Glaucium vitellinum hort. non Boiss. et Buhse	0	20	-	-	0(0)	2(2)	-	-
Hypecoum leptocarpum Hooker et Thompson	0	0	20	0	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Roemeria rhowadiflora Boiss.	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Fumariaceae								
Fumaria capreolata L.	0	100	30	100	0(0)	2(2)	1(1)	2(2)
Adlumia fungosa (Ait.)Greene	0	100	0	100	0(0)	3(3)	0(0)	3(3)

Fortsetzung Tab. 6

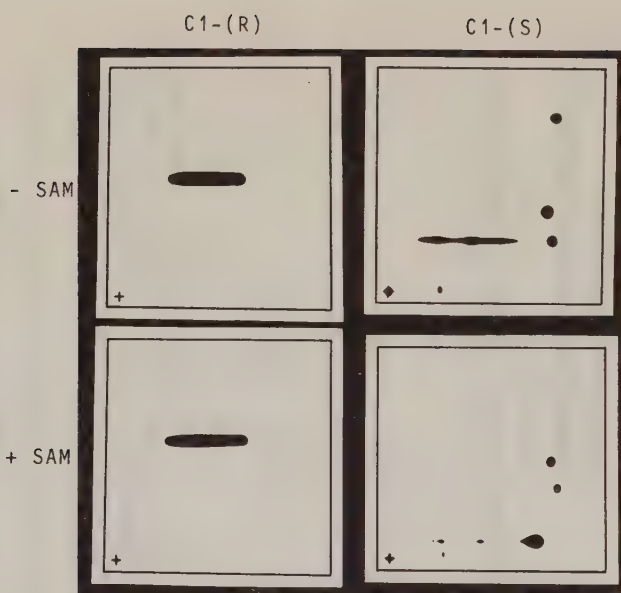
Zellkultur	Grad der Metabolisierung		Anzahl der Hauptprodukte		
	in %		(davon stereospezifisch gebildet)		
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM	mit SAM	
	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret.	(S)-Ret.
Fumariaceae					
<i>Corydalis vaginans</i> Royle	0	100	-	0(0)	2(2)
<i>Fumaria officinalis</i> L.	0	90	-	0(0)	2(2)
<i>Corydalis aurea</i> Willd.	0	30	0	0(0)	1(1)
<i>Dicentra spectabilis</i> (L.) Lem.	0	80	10	0(0)	1(1)
<i>Corydalis ophiocarpa</i> Hook. f. et Thoms.	0	5	-	0(0)	1(1)
<i>Fumaria muralis</i> Sond. ex Koch	0	10	-	0(0)	2(2)
Aristolochiaceae					
<i>Aristolochia maxima</i> L.	0	0	10	0(0)	0(0)
<i>Aristolochia clematidis</i> L.	0	0	0	0(0)	0(0)
Rutaceae					
<i>Ruta chalepensis</i> L.	0	10	30	0(0)	1(1)
					2(1)

Fortsetzung Tab. 6

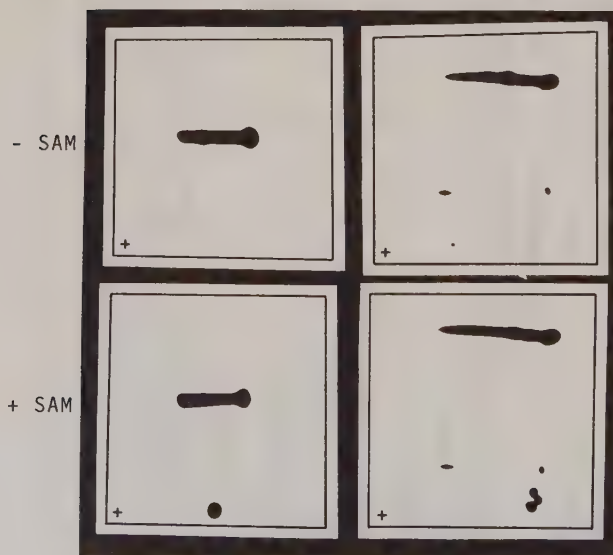
Zellkultur	Grad der Metabolisierung		Anzahl der Hauptprodukte	
	in %		(davon stereospezifisch gebildet)	
	ohne SAM	mit SAM	ohne SAM	mit SAM
	(R)-Ret. (S)-Ret. (R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret. (R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret. (R)-Ret. (S)-Ret.	(R)-Ret. (S)-Ret. (R)-Ret. (S)-Ret.
Kontrollen:				
Apocynaceae				
Catharanthus roseus (L.) G. Don	0	0	0	0
Solanaceae				
Nicotiana tabacum L.	0	0	0	0

Tab. 6: Metabolisierung von ($N^{14}CH_3$)-markiertem (R)- bzw. (S)-Retikulin durch Rohextrakte pflanzlicher Zellkulturen, z.T. in Anwesenheit von SAM (vgl. III.2.). Die verwendeten Kultivierungsmedien sind in Tab. 5 angegeben. Die Reaktionsprodukte wurden chromatographisch getrennt und autoradiographisch detektiert. Die Tabelle gibt Schätzwerte der visuellen Auswertung der Autoradiogramme wieder.

A



B



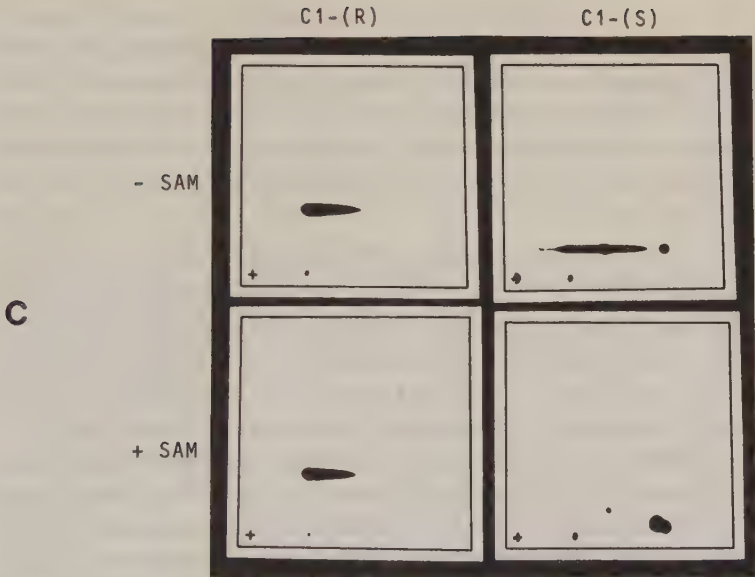


Abb. 10: Zweidimensionale, dünnschichtchromatographische Auftrennung von Metabolisierungsprodukten, die Rohextrakte aus (A) *Cissampelos mucronata*, (B) *Glaucium flavum* und (C) *Berberis beaniana*-Zellkulturen aus ($N^{14}CH_3$)-Retikulin bilden. 1. Dimension (vertikal): Laufmittelsystem 5; 2. Dimension (horizontal): Laufmittelsystem 6 (vgl. II.2.9.). C1-(R) bzw. C1-(S) bezeichnet die Stereokonfiguration des Chiralitätszentrums des Substrates, - SAM bzw. + SAM gibt die Ab- bzw. Anwesenheit dieses potentiellen Cosubstrates in den Inkubationsansätzen an.

bolisiert. Mit (R)-Retikulin als Substrat konnte dagegen in keinem einzigen Fall eine zellfreie Umsetzung zweifelsfrei demonstriert werden. Lediglich SAM-abhängige Methylierungsreaktionen ließen sich vereinzelt nachweisen. Keinerlei Umsatz zeigten auch im chromatographischen Test die Kontrollen Catharanthus roseus und Nicotiana tabacum (vgl. Tab. 6).

Die in Zellkulturen gefundene Aktivität des Berberinbrückenenzym sollte sich auch in differenzierten Pflanzen mit dem neuen Testsystem nachweisen lassen. Hier ergab sich, verglichen mit den Zellkulturen, ein etwas anderes Bild: von 18 getesteten Pflanzen, die 6 verschiedenen, durch Protoberberinalkaloide charakterisierten Familien angehören, konnte nur in 8 Enzymextrakten das Berberinbrückenenzym nachgewiesen werden. Selbst in 2 Arten, deren Zellkulturen das Enzym in großer Menge enthalten (Cissampelos mucronata, Berberis wilsoniae), war in den oberirdischen Teilen der differenzierten Pflanzen keine Enzymaktivität zu finden. Andererseits enthielten Eschscholtzia californica, Eschscholtzia lobbii, Chelidonium majus und Papaver somniferum sowohl als Zellkultur wie auch als differenzierte Pflanzen das Berberinbrückenenzym. Der Fall, daß zwar die differenzierte Pflanze, nicht aber die entsprechende Zellkultur die Enzymaktivität aufwies, wurde nicht beobachtet. Die weitaus höchste Aktivität des Berberinbrückenenzym in differenzierten Pflanzen wurde in Wurzeln von Papaver somniferum gefunden; demgegenüber konnte in den oberirdischen Teilen dieser Pflanze nur eine relativ geringe Enzymaktivität registriert werden. BÖHM und RINK (1975) konnten in Blattextrakten von Papaver somniferum keine Enzymaktivität nachweisen. Berücksichtigt man die geringere Empfindlichkeit des von ihnen verwendeten Testsystems, so steht dieser Befund durchaus in Einklang mit den hier berichteten Ergebnissen. Offenbar

ist in Papaver somniferum das Berberinbrückenenzym in erster Linie in den Wurzeln lokalisiert. Eine analoge Situation bei Berberis wilsoniae würde erklären, daß das Enzym in oberirdischen Teilen dieser Pflanze nicht nachgewiesen werden konnte. Bekannt ist, daß die gelbe Färbung der Berberitzenwurzel auf ihrem Gehalt an Protoberberinalkaloiden beruht (GESSNER, 1953). Der Nachweis des Berberinbrückenenzym in Wurzelgewebe von Berberis-Arten steht jedoch noch aus. In Übereinstimmung mit der Untersuchung von BÖHM und RINK (1975) steht der Befund, daß in den oberirdischen Teilen von Chelidonium majus das Berberinbrückenenzym enthalten ist.

Zwei Größen bestimmten die Auswahl der Zellkultur, aus der das Berberinbrückenenzym in größerem Maßstab isoliert werden sollten: zum einen die spezifische Enzymaktivität, die mit dem Tritium-Ausbaute test im Rohextrakt gemessen wurde, zum anderen die Gesamtaktivität, die pro Liter Suspensionskultur isoliert werden konnte. Wie aus Tab. 5 hervorgeht, unterschieden sich die getesteten Kulturen hinsichtlich dieser Eigenschaften erheblich. Die Kulturen mit der höchsten spezifischen bzw. absoluten Aktivität waren Berberis beaniana und Cissampelos mucronata. Berberis beaniana wurde als Quelle für die Gewinnung des Berberinbrückenenzym ausgewählt, weil diese Kultur schon vor mehreren Jahren etabliert worden war und innerhalb dieses Kultivierungszeitraums keinerlei erkennbaren Veränderungen gezeigt hatte.

3. Versuche zur Demonstration der Berberinbrückenenzymaktivität in Enzympräparationen aus Mäuseleber

Die biosynthetische Kapazität, Tetrahydrobenzylisochinoline in Alkaloide vom Protoberberintyp umzusetzen,

ist nicht auf das Pflanzenreich beschränkt. Das demonstrieren (1972) erstmals KAMETANI et al., die nach Verfütterung von (S)-Retikulin an Ratten das Protoberberinalkaloid Coreximin aus dem Harn der Tiere isolieren konnten. (1974) identifizierten CASHAW et al. verschiedene Protoberberine im Urin von Patienten mit Morbus Parkinson, die mit L-Dopa therapiert worden waren, was zur Akkumulation von Norlaudanosolin führt (SANDLER et al., 1973). Sie konnten darüberhinaus zeigen, daß aus Rattenleber bzw. -gehirn gewonnene Homogenate in der Lage sind, Norlaudanosolin mit (S-¹⁴CH₃)-SAM zu radioaktiven Protoberberinalkaloiden umzusetzen. Die bei dieser in vitro-Metabolisierung implizierten Teilreaktionen - N-Methylierung und anschließende Zyklisierung - sprachen sie der Katalyse ein und desselben Enzyms zu und nannten es zunächst Tetrahydroprotoberberin-Synthetase; in einer späteren Publikation, die seine Reinigung und Charakterisierung beschreibt, wurde es jedoch als Benzyltetrahydroisochinolin-Methyltransferase bezeichnet (MEYERSON und DAVIS, 1975).

KAMETANI et al. (1976) setzten bei ihrer Untersuchung der in vitro-Biosynthese der Tetrahydroprotoberberine durch Proteinextrakte aus Rattenleber N-methylierte Benzylisochinoline als Substrate ein. So demonstrierten sie die Umsetzung von markiertem (R,S)-Retikulin zu den Protoberberinen Coreximin und Scoulerin, aber auch seine Demethylierung zu N-Norretikulin. Die Frage, ob die Protoberberine erst nach der N-Demethylierung aus Norretikulin gebildet werden (analog der von CASHAW et al. (1974) beobachteten Reaktion), konnte verneint werden aufgrund des Befundes, daß (R,S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin zu radioaktivem Coreximin umgesetzt wurde (Ausbeute: 0,03-0,08 %)(KAMETANI et al., 1976). Andererseits wurde die Bildung der Protoberberine deutlich stimuliert durch NADPH, MgCl₂, Nicotinamid und molekularen Sauerstoff; diese Cofaktorabhängigkeit ist charakteristisch für micro-

somale mischfunktionelle Monoxygenasen, die (u.a.) oxidative N-Demethylierungen katalysieren (FORTH et al., 1977). Darüberhinaus zeigte die massenspektrometrische Analyse von Coreximmin, das aus N-Methyl-deutერიertem (R,S)-Retikulin biosynthetisiert worden war, daß diese Markierung nicht vollständig (Prozentsatz nicht angegeben) erhalten bleibt (KAMETANI et al., 1977). Zumindest teilweise entstehen die Protoberberine also nach N-Demethylierung des Retikulins, was auch durch den Befund bestätigt wird, daß Retikulin in Anwesenheit von (S - $^{14}\text{CH}_3$)-SAM und den für die oxydative N-Demethylierung erforderlichen Cofaktoren von Rattenleber-Microsomen-Präparationen zu radioaktivem Coreximmin umgesetzt wird (KAMETANI et al., 1980). Über die physiologische Bedeutung der Demethylierung N-methylierter Benzylisochinoline kann derzeit noch nicht entschieden werden (vgl. MELCHIOR und COLLINS, 1982). Aufschluß zu diesem Problem sollten die im folgenden beschriebenen Experimente erbringen.

Zur Demonstration einer N-Demethylierungsreaktion wurden Homogenate aus Mäuseleber und daraus gewonnene 9000 g-Überstände (vgl. II.2.2.1.) mit den enantiomeren, markierten Retikulin-Präparaten inkubiert und die enzymkatalysierte Freisetzung der Methylgruppe bestimmt. Methodisch wurde dabei das Verfahren des Tritium-Ausbautests angewandt. Dieses Testverfahren unterscheidet nicht zwischen der Tritium-Freisetzung bei der Berberinbrückenbildung und der bei einer N-Demethylierung. Aus diesem Grund wurden Parallelinkubationen mit (N - $^{14}\text{CH}_3$)-markiertem Retikulin als Substrat durchgeführt, um selektiv die letztgenannte Reaktion zu erfassen. Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,25 ml:

1. 3,6 mg (Rohhomogenat) oder 1,8 mg (9000 g-Überstand) Protein,
2. 25 μmol Tris/HCl-Puffer, pH 7,9,
3. (teilweise) 1,25 μmol MgCl_2 und 0,75 μmol NADPH und

4. als Substrat

177 pmol (R)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin ($\approx$ 7,8 nCi) oder
170 pmol (S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin ($\approx$ 7,8 nCi) oder
6,6 pmol (R)-(NC³H₃)-Retikulin ($\approx$ 21 nCi) oder
3,0 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin ($\approx$ 21 nCi).

Kontrollen enthielten Hitze-denaturiertes Protein. Ansätze, die Rohhomogenat als Katalysator enthielten, wurden 1 Stunde, diejenigen mit dem 9000 g-Überstand 10 Stunden bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der Radioaktivitätsgehalt der Kohleüberstände der Ansätze bestimmt, wobei wie unter III.1.4. beschrieben verfahren wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

Die gemessenen Effekte waren im allgemeinen gering, jedoch signifikant höher als in den Kontrollansätzen mit inaktiviertem Enzym. Auch in den Ansätzen, die (N¹⁴CH₃)-markierte Substrate enthielten, war zweifelsfrei eine enzymkatalysierte Radioaktivitäts-Freisetzung zu beobachten. Dieser Befund zeigt, daß der Tritium-Ausbau nicht ausschließlich mit der Berberinbrückenbildung erklärt werden kann, sondern teilweise auf der N-Demethylierung des Retikulins beruht. Deutliche Unterschiede im Grad der Metabolisierung, abhängig von der verwendeten Enzympräparation, waren nicht zu verzeichnen. Ebenso wenig wurde die bevorzugte Umsetzung eines Enantiomers der angebotenen ¹⁴C- und ³H-markierten Substrate festgestellt. In diesem Zusammenhang ist der Befund erwähnenswert, daß die Biosynthese der Protoberberine durch Rattenleber-Microsomen unabhängig von der Chiralität des Substrats Retikulin erfolgt (KAMETANI et al., 1980). Der Zusatz der Cofaktoren MgCl₂ und NADPH zeigte eine stimulierende Wirkung, die bei der Verwendung der Tritium-markierten Substrate ausgeprägter war.

Einen direkten Zugang zu der Frage, in welchem Umfang N-Demethylierung und/oder Berberinbrückenbildung für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, versprach die

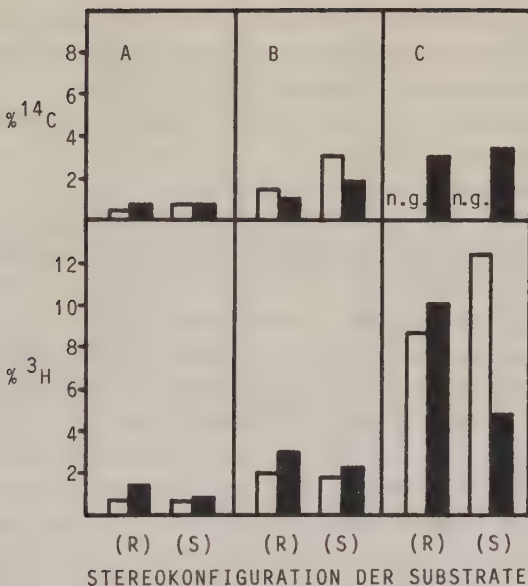


Abb. 11: Demethylierung von ($N^{14}CH_3$)- (oben) und (NC^3H_3)- (unten) (R)- bzw. (S)-Retikulin durch Rohhomogenate (helle Balken) und daraus hergestellten 9000 g-Überständen (dunkle Balken) aus Mäuseleber, gemessen am prozentualen Radioaktivitäts-Anteil des Kohleüberstandes der Inkubationsansätze an der eingesetzten Gesamtradioaktivitätsmenge. A: Kontrolle (Hitze-denaturiertes Enzym), B: ohne Cofaktoren, C: mit $MgCl_2$ und NADPH. Weitere Erläuterungen im Text. n.g.: nicht gemessen.

chromatographische Analyse der radioaktiven Stoffwechselprodukte des Retikulins. Zu diesem Zweck wurde die Metabolisierung eines Retikulinpräparates untersucht, das eine Markierung trug, welche durch keine der interessierenden Reaktionen angegriffen werden sollte, nämlich (R,S)-(C1-³H)-

Retikulin. Diese Verbindung war von AMANN (1982) synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Testansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 190 μ l (in Anlehnung an KAMETANI et al., 1977):

1. 1,8 mg Protein (9000 g-Überstand eines Mäuseleberhomogenates, vgl. II.2.2.1.),
2. 9,5 μ mol Phosphatpuffer, pH 7,5,
3. 0,58 μ mol (R,S)-(C1-³H)-Retikulin (= 0,60 μ Ci),
4. (teilweise) 1,5 μ mol $MgCl_2$, 1,9 μ mol Nicotinamid und 0,60 μ mol NADPH und
5. (teilweise) 0,60 μ mol Formaldehyd.

Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert; 20 μ l-Aliquots wurden nach 0-, 2-, 5- und 23-stündiger Inkubation im Laufmittelsystem 7 (vgl. II.2.9.) chromatographiert. Bei allen Ansätzen ergab sich ein völlig übereinstimmendes Bild: Retikulin wurde zeitabhängig umgesetzt zu einem unbekannten Produkt mit einem Rf-Wert von 0 (Abb. 12). Coreximin, Scoulerin oder Norretikulin wurden nicht gebildet. Ein Einfluß der Cofaktoren und/oder des Formaldehyds, das nach einer Demethylierung des Retikulins evtl. mit Norretikulin zu Protoberberinen kondensieren könnte, wurde nicht beobachtet.

Eine Demonstration der von KAMETANI et al. (1976, 1977, 1980) beschriebenen Reaktionen durch die Katalyse eines Proteinextraktes aus Mäuseleber gelang also nicht. Vielmehr wurde gezeigt, daß der hauptsächliche Stoffwechselweg des Retikulins zu einem anderen, nicht identifizierten Produkt führt. Dieser Befund ist besonders erstaunlich in Anbetracht der Ausbeuten an Scoulerin und Coreximin, die KAMETANI et al. (1977) berichteten: 7,4 bzw. 22,2 %. Da die Versuchsergebnisse keinerlei Aufschluß hinsichtlich der Frage gaben, ob Protoberberine in tierischen Geweben aus N-Methyl-substituierten Benzylisochinolininen oder aus ihren N-Nor-Derivaten gebildet werden, wurde diese Problemstellung nicht weiter verfolgt.

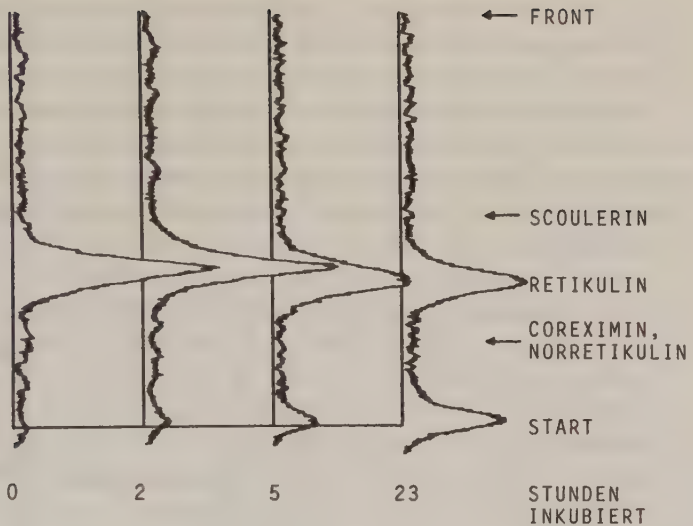


Abb. 12: Chromatographische Analyse der Metabolisierungs-
kinetik von (R,S)-(C1-³H)-Retikulin durch einen
Mäuseleber-Proteinextrakt. Nähere Angaben im Text.

4. Kinetik der Berberinbrückenenzym-Bildung in Berberis beaniana Schneid.-Zellkultur

Nachdem sich die Berberis beaniana-Zellsuspensions-
kultur als ergiebige Quelle für das Berberinbrückenenzym
erwiesen hatte und als Ausgangsmaterial für die weiteren
Untersuchungen ausgewählt worden war, erhob sich die Frage
nach dem günstigsten Zeitpunkt für die Ernte der Kultur.
Zu ihrer Beantwortung wurde folgendermaßen verfahren:

11 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit 250 ml LS-Medium wur-
den inokuliert mit je 20 g (FG) Zellmaterial und unter
Standardbedingungen (vgl. II.1.1.3.) kultiviert. Nach un-

terschiedlicher Wuchsdauer wurden die einzelnen Kolben geerntet; ein Aliquot des Zellmaterials wurde für die Enzympräparation, ein weiteres für die Trockengewichtsbestimmung verwendet. Die Gewinnung der Enzymrohextrakte sowie die Messung der Enzymaktivität erfolgten wie in Kapitel III.2. beschrieben. Das Ergebnis dieser Versuchsserie ist in Abb. 13 dargestellt. Es wurde ein steilflankiges Aktivitätsma-

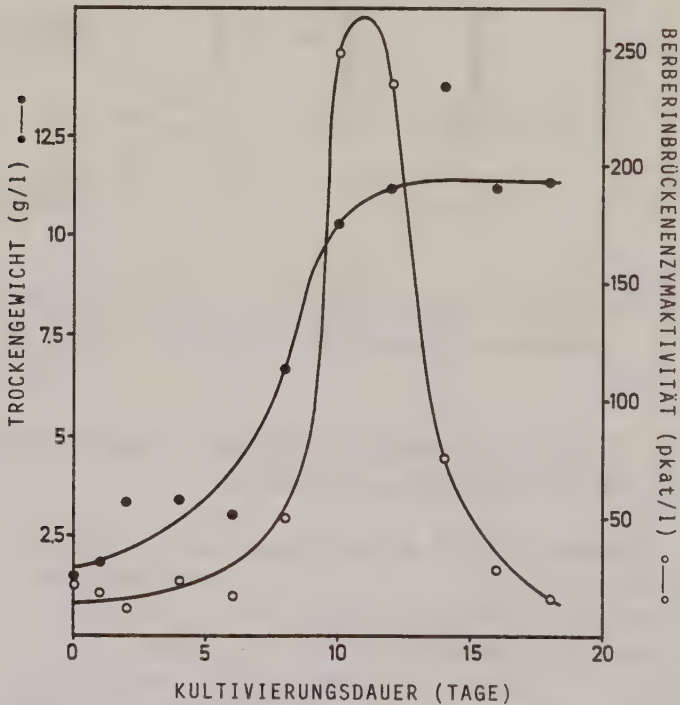


Abb. 13: Kinetik der Trockengewichtszunahme und der Berberinbrückenenzym-Bildung in Berberis beaniana-Zellkultur. Anzucht unter Standardbedingungen.

ximum des Berberinbrückenenzym nach etwa 10- bis 11-tägiger Kultivierungsdauer registriert, zu einem Zeitpunkt, an dem die Kultur sich am Übergang zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase befand. Dieser Zeitpunkt wurde bei der präparativen Anzucht der B. beaniana-Kultur entweder für die erneute Subkultivierung oder für die Ernte des Gewebes eingehalten. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Berberinbrückenenzym-Synthese in B. beaniana mit demjenigen der Protoberberinbildung in Berberis stolonifera-Zellkulturen (HINZ und ZENK, 1981), so zeigt sich eine Übereinstimmung der beiden Parameter in der ansteigenden Phase der Kinetik, während der Abfall der Enzymaktivität korreliert ist mit einer Stagnation der Alkaloidproduktion. Dieser Vergleich ist erlaubt aufgrund der engen Verwandtschaft der beiden Kulturen und der Ähnlichkeit in ihrem Wuchsverhalten. Die Befunde sprechen für einen kausalen Zusammenhang zwischen der gemessenen Enzymaktivität und der Protoberberin-Biosynthese.

BÖHM und RINK (1975) fanden in Macleaya microcarpa-Suspensionskulturen einen anderen Verlauf der Berberinbrückenenzym-Bildung. Sie registrierten schon nach 2-tägiger Dauer der Subkultivierung ein Aktivitätsmaximum, deutlich vor einer erkennbaren Zunahme des Zellgewichts. Mit einer ca. 24-stündigen Verzögerung gegenüber der Enzymsynthese erfolgte eine Konzentrationszunahme der Alkaloide Protopin und Allokryptopin in den Kulturen. Die Autoren interpretierten diesen Befund als Hinweis auf eine Funktion des Berberinbrückenenzym in der Biosynthese der genannten Alkaloide.

5. Reinigung des Berberinbrückenenzym aus Berberis beaniana Schneid.-Zellkultur

5.1. Interferenz der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase im Tritium-Ausbautest

Bei der Reinigung des Berberinbrückenenzym wurde die in Kapitel III.1.4. beschriebene Testmethode (Tritium-Ausbautest) routinemäßig zur Bestimmung der Enzymaktivität angewendet. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, daß die zur Gewinnung des Enzyms ausgesuchte Zellkultur, B. beaniana, ein weiteres Enzym produziert, das in diesem Testverfahren interferiert. Dieses Enzym wurde identifiziert als (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase; es katalysiert die unmittelbare biosynthetische Folgereaktion des Berberinbrückenenzym, nämlich die Aromatisierung des C-Ringes des Scoulerins, der durch die Ausbildung der Berberinbrücke entsteht (vgl. Abb. 5) (AMANN et al., 1984). Das (C8-³H₂)-Scoulerin, das aus (NC³H₃)-Retikulin durch die Katalyse des Berberinbrückenenzym gebildet wird, verliert bei dieser Aromatisierung ein weiteres Tritiumatom. Dieser zusätzliche Verlust wird im Tritium-Ausbautest miterfaßt. Das Testverfahren registriert daher nicht ausschließlich die Aktivität des Berberinbrückenenzym, sondern zusätzlich auch die der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase. Die Demonstration dieses Sachverhaltes gelang erst nach der Trennung der beiden Aktivitäten (vgl. III.5.2.-III.5.5.) mit den folgenden Experimenten:

(S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin (760 pmol, 35 nCi) wurde jeweils mit dialysiertem Rohextrakt (2,9 µg Protein; vgl. III.5.2.), Hitze-inaktiviertem Rohextrakt, angereichertem Berberinbrückenenzym (0,33 µg Protein; vgl. III.5.4.) und mit angereichertem Berberinbrückenenzym (0,16 µg Protein)

plus der abgetrennten (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (0,12 µg Protein; vgl. III.5.3.) in Ansätzen inkubiert, die in einem Volumen von 20 µl zusätzlich 1 µmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, enthielten. Nach 150-minütiger Inkubation bei 30°C wurden 7 µl-Aliquots in Laufmittelsystem 10 (vgl. II.2.9.) chromatographiert und die Radioaktivitätsverteilung der Chromatogramme untersucht. Die Resultate gibt Abb. 14 wieder. Im Rohextrakt wird Scoulerin kaum akkumuliert, sondern weiter metabolisiert zum aromatischen Folgeprodukt. Erst mit angereichertem Berberinbrückenenzym als Katalysator bildet Scoulerin das Endprodukt. Ein vergleichbarer Ansatz, der zusätzlich angerei-

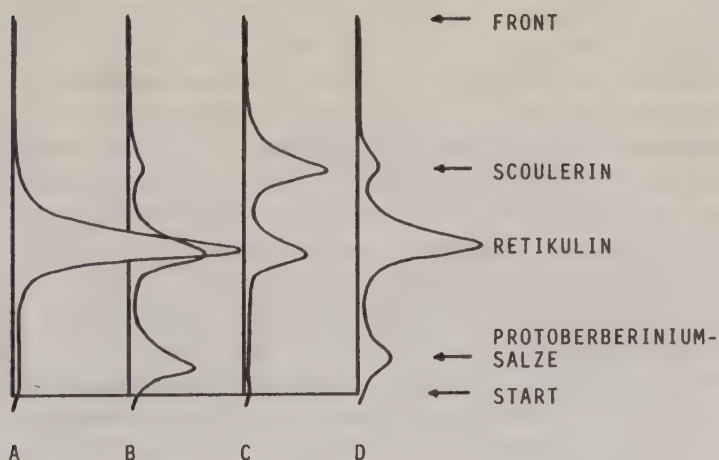


Abb. 14: Metabolisierung von (S)-(N¹⁴CH₃)-Retikulin durch (A) Hitze-inaktivierten Rohextrakt, (B) aktiven Rohextrakt, (C) angereichertes Berberinbrückenenzym und angereicherte (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase aus B. beaniana-Zellkultur. Weitere Angaben im Text.

cherte (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase enthält, bildet hingegen das Protoberberinium-Salz, ganz übereinstimmend mit dem Befund des Rohextrakt-Ansatzes.

Die hier verwendeten Enzympräparate wurden auch hinsichtlich ihrer Effekte im Tritium-Ausbaute test untersucht. Drei identische Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 350 μ l 35 μ mol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 1,02 nmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (184 nCi) und 45 μ g Protein (angereichertes Berberinbrückenenzym, vgl. III.5.4.). Nach 1-, 3-, 6-, 10- und 16-minütiger Inkubation bei 30°C wurden 20 μ l-Aliquots entnommen, mit 20 μ l H₂O und 100 μ l Kohlesuspension versetzt und im Standardverfahren analysiert. Nach 20 min. wurde den Restansätzen (Volumen: 250 μ l) angereichertes Berberinbrückenenzym (45 μ g Protein, vgl. III.5.4.), angereicherte (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (55 μ g Protein; vgl. III.5.3.) bzw. dialysierter Rohextrakt (280 μ g Protein, vgl. III.5.2.) (jeweils in 250 μ l Aufschlußpuffer, vgl. III.5.2.) aus B. beaniana-Zellkultur zugegeben. Die Ansätze wurden weiter inkubiert; nach 23, 25, 28, 32 und 38 min. wurden 40 μ l-Aliquots nach dem zuvor genannten Verfahren untersucht. Die Kinetik der Radioaktivitäts-Freisetzung, ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Gesamtradioaktivität, ist in Abb. 15 dargestellt. Die Befunde zeigen, daß nur angereichertes Berberinbrückenenzym, das frei ist von der interferierenden Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase, annähernd den theoretisch zu erwartenden maximalen Ausbau von 33 % der Tritiummarkierung erzielt. Setzt man Rohextrakt oder angereicherte (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase dem Ansatz zu, erhöht sich die Tritium-Freisetzung auf etwa 66 % der Gesamtradioaktivitätsmenge. Rohextrakt allein bewirkt ebenfalls einen 66 %-igen Tritiumausbau (hier nicht gezeigt; vgl. Abb. 16).

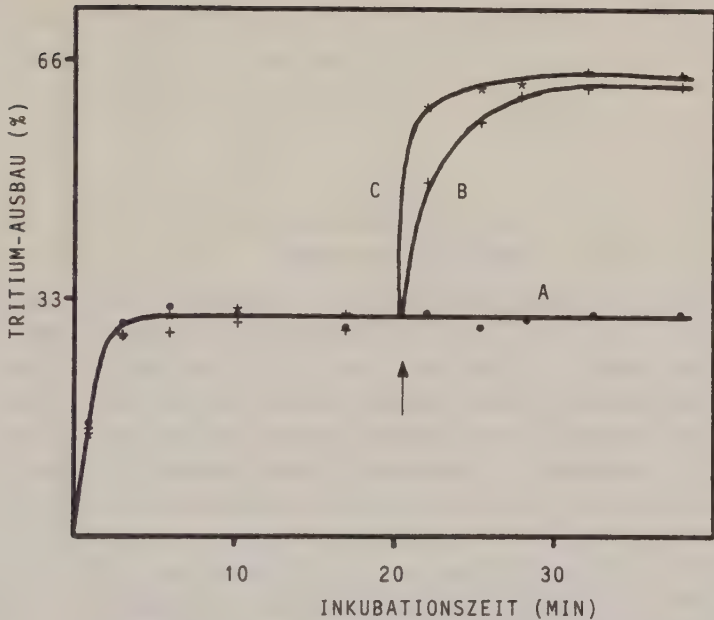


Abb. 15: Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC³H₃)-Retikulin durch angereichertes Berberinbrückenenzym (A) allein, (B) zusammen mit angereicherter(S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase und (C) zusammen mit dialysiertem Rohextrakt aus *B. beaniana*-Zellkultur. Zugabe der verschiedenen Enzympräparate nach 20-minütiger Inkubation (Pfeil). Weitere Angaben im Text.

Die im folgenden geschilderte Reinigungsprozedur wurde unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, eine möglichst vollständige Trennung von Berberinbrückenenzym und (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase zu erreichen. Hierbei kam der Umstand zustatten, daß das letztgenannte Enzym eine weitere

katalytische Aktivität besitzt: es transformiert (S)-Retikulin in (1,2)-Dehydroretikulin (AMANN, 1982). Es konnte daher selektiv aufgrund seiner Fähigkeit nachgewiesen werden, Tritium aus (R,S)-(C1-³H)-Retikulin abzuspalten (vgl. II.2.3.2.).

5.2. Zellaufschluß, Rohextraktgewinnung und Voranreicherung des Berberinbrückenenzym

Die Gewinnung des Rohextraktes erfolgte wie in Kapitel II.2.2.3. beschrieben. Als generell verwendeter Puffer diente 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4. 250 g des tiefgefrorenen, gelbgefärbten Zellmaterials ($\approx$ 9,65 g TG) wurden in 300 ml dieses Puffers aufgeschossen. Der aus dieser Suspension gewonnene, klarzentrifugierte Preßsaft bildete den Rohextrakt, der intensiv gelb gefärbt war. Wie ein Vergleich seiner Enzymaktivität mit der eines dialysierten Aliquots zeigte, enthielt er niedermolekulare Komponenten, die das Berberinbrückenenzym drastisch inhibieren (Abb.16). Als Bezugsaktivität für die Berechnung der Anreicherung in den folgenden Reinigungsschritten wurde daher diejenige des dialysierten, nicht gehemmten Rohextraktes zugrunde gelegt. Zur Entfernung der hemmenden Substanzen und einer gleichzeitigen Grobanreicherung des Berberinbrückenenzym wurde versuchsweise eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Während das erste Ziel mit dieser Methode erreicht werden kann, verhindert der Umstand, daß das Berberinbrückenenzym mit der Masse der Proteine ausfällt, nämlich im Bereich von 35-65 % der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration, eine effektive Anreicherung. Daher wurde ein anderes Verfahren angewendet. Da bekannt war, daß Berberis-Zellkulturextrakte große Mengen an quaternären Protoberberinalkaloiden, vor allem an Jatrorrhizin enthalten (HINZ und ZENK, 1981), lag die Möglichkeit einer

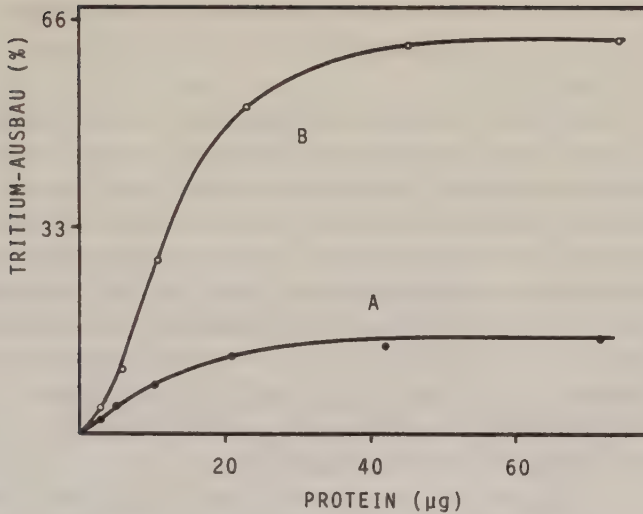


Abb. 16: Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC³H₃)-Retikulin durch Rohextrakt (A) und dialysierten Rohextrakt (B) im Standardtestverfahren, als Beweis für die Anwesenheit hemmender niedermolekularer Verbindungen im Rohextrakt.

Endprodukthemmung des Berberinbrückenenzym durch diese Substanzen nahe. Sie wurden in zwei Schritten abgetrennt. Im ersten Schritt wurde die kationische Natur dieser Alkaloide ausgenutzt. Zum Extrakt wurden 160 g äquilibrierte Carboxymethyl-Sephadex gegeben und die entstandene Suspension ca. 5 min. moderat geschüttelt. Anschließend wurde der Kationenaustauscher am Rundfilter abgetrennt. Die Effektivität des Schrittes ließ sich daran ablesen, daß das Filtrat nur noch schwach gelblich, das Gel hingegen hellgelb gefärbt war. Die im Rohextrakt beobachtete Enzymhemmung

war bei der so vorbehandelten Präparation weit weniger ausgeprägt. 34 % der Gesamtproteinmenge wurden in diesem Schritt abgetrennt.

Im zweiten Schritt wurden restliche Alkaloide durch Adsorption an Dextran-beschichtete Aktivkohle aus dem Enzymextrakt entfernt (in Anlehnung an TREIMER, 1979). Dazu wurde das Präparat mit einer Lösung versetzt, die in 90 ml Standardpuffer 225 mg Dextran und 9,0 g Aktivkohle enthielt, bis eine Endkonzentration von 5 % (v/v) erreicht war, und kurz (1 min.) agitiert. So wurde eine weitgehende Bindung der inhibierenden Substanzen ohne größere Aktivitätseinbußen (vgl. Tab. 7) erreicht. Das blaß-bräunliche Kohlefiltrat zeigte keine durch Dialyse aufhebbare Enzymhemmung mehr.

Zur Konzentrierung wurde der Extrakt mit etwa 60 g äquilibriertem DEAE-Anionenaustauscher (Sephacel) versetzt und die Suspension in eine Säule (4,7 cm ϕ x 40 cm Höhe) gefüllt. Nachdem das Gel sich abgesetzt hatte, wurde der Extrakt schnell (5 ml/min.) durch das Gelbett gepumpt. Das Eluat enthielt 63 % des Gesamtproteins, jedoch keine Enzymaktivität. Das Enzym wurde anschließend mit gepufferter 0,3 M KCl-Lösung bei einer Flußrate von 1 ml/min. von der Säule eluiert, typischerweise in einem Volumen von 30-40 ml.

Durch diese Grobfraktionierung des Rohextraktes wurde das Berberinbrückenenzym etwa 5-fach angereichert, ohne daß nennenswerte Aktivitätsverluste in Kauf genommen werden mußten. Eine Abtrennung der interferierenden (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase gelang nur in sehr beschränktem Maß (vgl. Tab. 7).

5.3. Gelfiltration an Ultrogel AcA 54

Gelfiltration ist ein chromatographisches Verfahren zur Fraktionierung von Molekülen aufgrund ihrer Größenunterschiede. Es wird sowohl für analytische (vgl. III.6.6.) als auch für präparative Zwecke eingesetzt. Die Vorzüge dieser Trenntechnik bestehen in ihrer Einfachheit, ihrer guten Reproduzierbarkeit und ihrem schonenden Charakter. Die zur Reinigung des Berberinbrückenenzym verwendete Matrix Ultrogel AcA 54 ist ein Polymerisat aus 5 % Polyacrylamid und 4 % Agarose, das einen Fraktionierungsbereich von 5 bis 70 kD für globuläre Proteine aufweist.

Abb. 17 zeigt das charakteristische Elutionsprofil, das bei der Auftrennung des konzentrierten DEAE-Sephacel-Eluats (vgl. III.5.2.) an dieser Matrix vollkommen reproduzierbar resultierte. Sowohl das Berberinbrückenenzym als auch die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase zeigten eine zweigipfelige Aktivitätsverteilung, jeweils bestehend aus einem dominanten Haupt- und einem Neben-Aktivitätsmaximum. Für das letztgenannte Enzym demonstrierte diesen Sachverhalt bereits AMANN (1982). Während die Hauptaktivitäten der beiden Enzyme deutlich voneinander getrennt wurden, interferierten die Neben-Aktivitätsmaxima mit den Haupt-Aktivitätsmaxima des jeweils anderen Enzyms. In den vereinigten Fraktionen, die das Hauptmaximum der Berberinbrückenenzym-Aktivität bildeten, konnten nur 18 % der aufgegebenen Enzymaktivität nachgewiesen werden. Daher wurde in diesem Reinigungsschritt keine Anreicherung erzielt, obwohl 77 % der Gesamtproteinmenge abgetrennt wurden. Die Einbuße an Enzymaktivität beruht jedoch nicht auf einer Inaktivierung des Enzyms. Rechromatographiert man nämlich angereichertes Berberinbrückenenzym an Ultrogel AcA 54, so erhält man praktisch quantitative Aktivitätsausbeuten. Zum Teil erklärt sich der Aktivitätsverlust mit der vollständigen Abtrennung der Hauptaktivität der im Testsystem

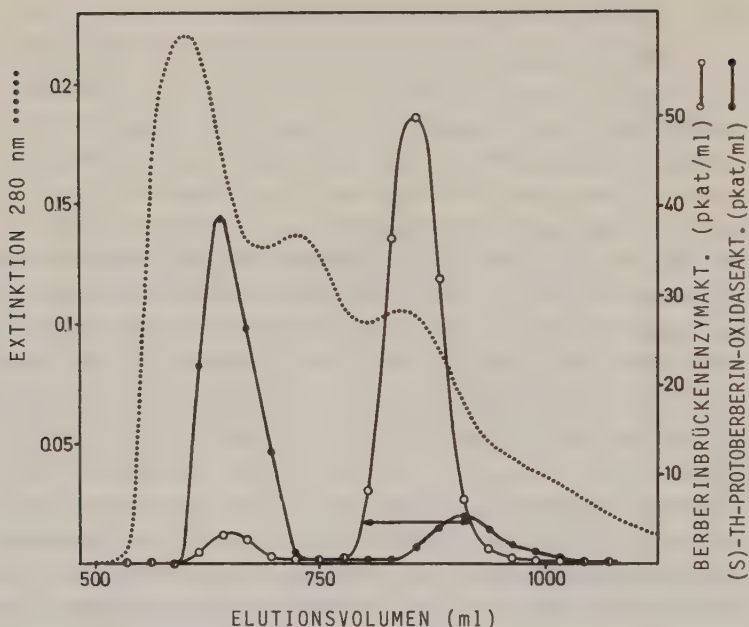


Abb. 17: Fraktionierung eines vorbehandelten Enzymextrakts aus *B. beaniana*-Zellkultur (Volumen: 39 ml; Proteingehalt: 145 mg) durch Gelfiltration an Ultragel AcA 54. Säulenabmessungen: 5,0 cm ϕ x 93 cm Höhe; Flußrate: 1,1 ml/min.; Elutionsmittel: Standardpuffer. Messung des Berberinbrückenenzym im Standardtest (III.1.4.), der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase nach dem unter II.2.3.2. beschriebenen Verfahren. Der Pfeil zeigt den Teil des Eluates an, der vereinigt und zur weiteren Reinigung des Berberinbrückenenzym verwendet wurde.

interferierenden (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase. Durch den Zusatz dieses Enzyms (0,14 pkat, 2,7 μ g Protein) zu dem

angereicherten Berberinbrückenenzym (0-0,2 pkat, 0-3,6 μ g Protein) erhöht sich die im Standardtest gemessene Rate der Tritium-Freisetzung um den Faktor 1,5.

Das vereinigte Eluat mit Berberinbrückenenzym-Aktivität enthielt noch 2,7 % der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität, die vor dem Gelfiltrationsschritt gemessen wurde. Zur Abtrennung der verbliebenen Aktivität wurde das Enzympräparat durch Ionenaustauschchromatographie weiter gereinigt.

5.4. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Mit Diäthylaminoäthylgruppen substituierte Cellulose ist ein schwach basischer Anionenaustauscher, der weite Verbreitung auf dem Gebiet der Proteinreinigung gefunden hat. An seine funktionellen Gruppen, die bei physiologischen pH-Werten positiv geladen sind, können Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen adsorbiert werden. Abhängig von der Ausprägung ihrer negativen Nettoladung werden sie durch anorganische Anionen früher oder später von der Matrix kompetitiv verdrängt und auf diese Weise fraktioniert. Der hier verwendete Ionenaustauscher DEAE-Sephacel hat eine mikro-granuläre, gelartige Struktur, die einen gleichmäßigen Fluß des Elutionsmittels gewährleistet und sich deshalb vorteilhaft auf die Trennleistung auswirkt.

Die Fraktionierung des durch Gelfiltration vorgereinigten Berberinbrückenenzym an diesem Ionenaustauscher ist in Abb. 18 dargestellt. Während das Berberinbrückenenzym ein einheitliches Aktivitätsmaximum zeigte, spaltete sich die verbliebene Aktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase erneut in ein Haupt- und ein Nebenmaximum auf. Die abgetrennte Nebenaktivität interferierte wiederum

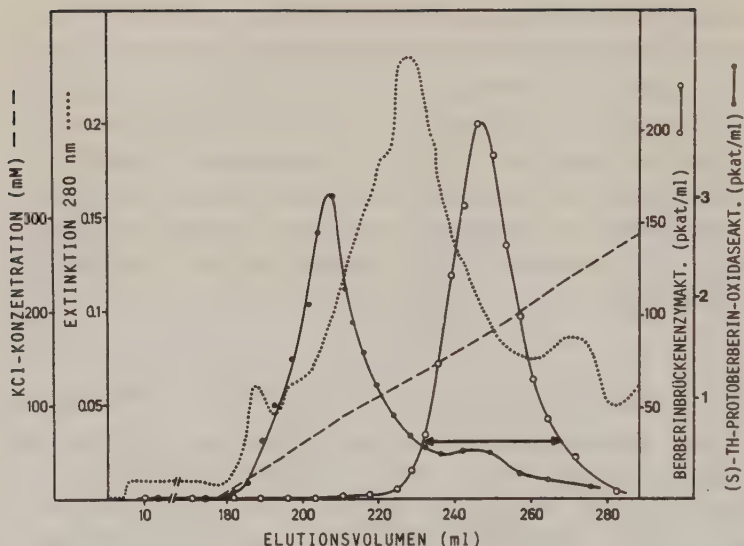


Abb. 18: Fraktionierung eines vorbehandelten Berberinbrückenenzym-Präparats aus *B. beaniana*-Zellkultur (Volumen: 147 ml; Proteingehalt: 33 mg; vgl. III. 5.3.) durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel. Säulenabmessungen: 1,4 cm ϕ x 6,0 cm Höhe; Flußrate: 0,3 ml/min.; Elutionsmittel: 0-300 mM KCl in Standardpuffer. Aktivitätsbestimmungen wie in Abb. 17 angegeben. Der durch den Pfeil gekennzeichnete Teil des Eluats wurde zur weiteren Reinigung des Berberinbrückenenzymakts benutzt.

mit der Aktivität des Berberinbrückenenzymakts; sie repräsentierte ca. 4 % der angegebenen Gesamtaktivität der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase.

In diesem Reinigungsschritt wurde ein Anreicherungsfaktor von 2,8 erzielt. 65 % der Gesamtproteinmenge wurden

abgetrennt; die Verluste an Berberinbrückenenzym-Aktivität waren unerheblich (vgl. Tab. 7).

5.5. Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose

Ein für jedes Protein charakteristisches Merkmal ist das Ausmaß seiner Hydrophilie bzw. Hydrophobie. Diesen Umstand macht sich die sogenannte hydrophobe Chromatographie zunutze: sie verwendet zur Fraktionierung von Proteinen deren unterschiedliche Tendenz, hydrophobe Wechselwirkungen mit einer ungeladenen stationären Phase auszubilden. Man kann solche Wechselwirkungen intensivieren durch eine hohe Ionenstärke des Lösungsmittels bzw. schwächen durch geringe Ionenstärken und unpolare Lösungsmittel. Auf diese Weise lassen sich Adsorption und Elution von Proteinen kontrollieren.

Zur Anreicherung des Berberinbrückenenzyms mit dieser chromatographischen Technik wurde Phenyl-Sepharose verwendet. Dieses elektrisch neutrale Medium bildet nur relativ schwache hydrophobe Wechselwirkungen aus, vornehmlich über die π -Elektronenwolken seiner funktionellen Gruppen mit denen aromatischer Aminosäuren. Das hat den Vorteil, daß gebundene Substanzen schon mit vergleichsweise schonenden Elutionsmitteln wieder desorbiert werden können.

Abb. 19 zeigt die Fraktionierung des DEAE-Sephacel-Eluats mit Berberinbrückenenzym-Aktivität (vgl. III.5.4.) an Phenyl-Sepharose. Während das Enzym unter den angegebenen Bedingungen an die Matrix adsorbiert wurde, konnten 66 % der Gesamtproteinmenge schon bei der Probenaufgabe im Säuleneluat nachgewiesen werden. Da die anschließende elektrophoretische Reinigung ein Proteinpräparat von geringem Volumen erforderte, wurde das Enzym in sehr konzentrierter Form (ca. 1,2 mg Protein/ml) mit einem Äthanol/H₂O-Gemisch

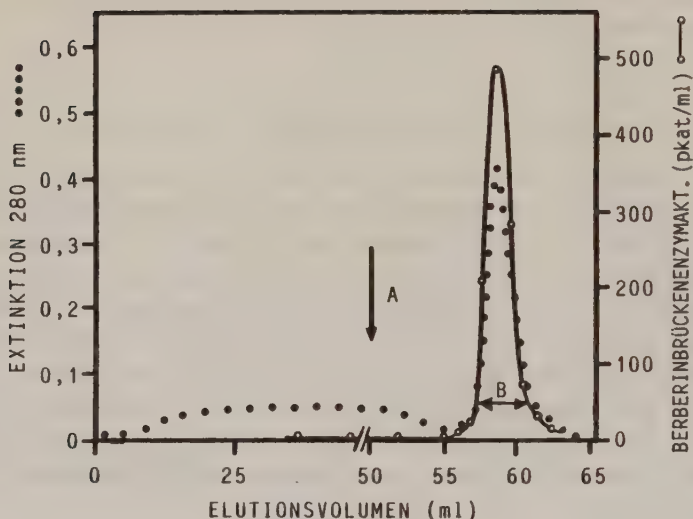


Abb. 19: Fraktionierung und Konzentrierung eines angereicherten Berberinbrückenenzym-Präparats aus *B. beaniana*-Zellkultur (DEAE-Sephacel-Eluat, vgl. IIY.5.4.; Volumen: 42 ml; Proteingehalt: 12 mg; KCl-Konzentration: 90 mM) an Phenyl-Sepharose. Die Säule (1,0 cm ϕ x 6,5 cm Höhe) war mit 100 mM KCl in Standardpuffer äquilibriert worden. Flußrate: 0,5 ml/min. (Probenaufgabe und Nachwasch mit Äquilibrationpuffer) bzw. 0,18 ml/min. (Elution mit Äthanol/H₂O (v/v= 25/75)). Aktivitätsbestimmung des Berberinbrückenenzym wie in Abb. 17 angegeben. Pfeil A kennzeichnet den Beginn der Elution, Pfeil B das vereinigte Eluat.

(v/v= 25/75) von der Säule eluiert. Der Prozeß konnte visuell verfolgt werden: das Enzympräparat lief als scharfe, braungefärbte Bande an der Front des Elutionsmittels durch die Säule. Unmittelbar nach der Elution wurden die vereinigten aktiven Fraktionen (3,4 ml) gegen Standardpuffer dia-

lysiert. Das Dialysat wurde durch Vakuum-Ultrafiltration in Kollodium-Hülsen auf ein Volumen von ca. 850 µl eingengt.

Die Berberinbrückenenzym-Aktivität des Konzentrats betrug etwa 50 % derjenigen des DEAE-Sephacel-Eluats (III. 5.4.). Das Enzym wurde in dem hier beschriebenen Reinigungsschritt etwa 1,4-fach angereichert. 74 % der verbliebenen (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität wurden abgetrennt.

5.6. Präparative Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen

Eine Trenntechnik, die besonders in der Analytik von Proteinen und Nukleinsäuren eine herausragende Bedeutung erlangt hat, ist die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen. Dies verdankt sie vor allem zwei Vorzügen: ihrer vielseitigen Anwendbarkeit und ihrem außerordentlichen Auflösungsvermögen. Die einzelnen Komponenten komplexer Substanzgemische werden voneinander getrennt, indem sie sich unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes durch eine Polyacrylamidmatrix bewegen. Ihre Größe und ihre Nettoladung sind hierbei bestimmend für ihre Wanderungsgeschwindigkeit; Unterschiede in diesen Eigenschaften führen zu ihrer Fraktionierung. Eine Limitierung der Methode bildet ihre im allgemeinen geringe Kapazität an Probenmaterial. Für präparative Reinigungszwecke wird sie daher meist am Ende einer Anreicherungsprozedur eingesetzt.

Zur weiteren Reinigung, aber auch zu einer qualitativen Bestimmung verbliebener Störaktivitäten des vorbehandelten Berberinbrückenenzym-Präparates wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach MAURER (1968) verwendet. Diskontinuierliche Gelsysteme bestehen aus einem sogenannten Sammel- und einem Trenngel, die sich in ihren Puffersyste-

men (pH-Werten) und ihren Polyacrylamid-Konzentrationen unterscheiden. Probenlösungen durchlaufen zunächst das Sammelgel, auf dem sie zu äußerst scharfen Banden konzentriert werden. Dadurch ist eine hohe Auflösung bei der anschließenden Fraktionierung der Probe im Trenngel gewährleistet.

Die elektrophoretische Auftrennung des aktiven Phenyl-Sepharose-Eluats (III.5.5.) ist in Abb. 20 dargestellt. Wie die Protein- und Aktivitätsverteilung (Gele A und D) erkennen läßt, ist das Enzympräparat vor diesem Reinigungsschritt noch in erheblichem Umfang mit Fremdprotein verunreinigt. Peroxidasen und eventuell andere eisenhaltige Proteine sind offensichtlich maßgebliche Kontaminanten (Gele B und C). Beide können mit dem verwendeten Reinigungsverfahren quantitativ abgetrennt werden; der die Berberinbrückenenzym-Aktivität enthaltende Abschnitt des Gels zeigt keine Reaktion im Farbtest für den Eisennachweis. Katalase-Aktivität konnte ausschließlich in einer scharfen Bande am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Das aktive Eluat, das durch die Extraktion der fraktionierten Gele gewonnen wurde, war frei von nachweisbaren Mengen an (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität; es enthielt 34 % der eingesetzten Berberinbrückenenzym-Aktivität. In diesem Reinigungsschritt wurde ein Anreicherungsfaktor von 9,5 erzielt (Gesamtanreicherung: 145-fach).

5.7. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist eine hochauflösende elektrophoretische Trennmethode für Proteine, die sowohl für analytische wie für präparative Zwecke verwendet wird. Sie nutzt die zwitterionische Natur der Proteine zu ihrer Auftrennung in einem Medium, in dem ein stabiler

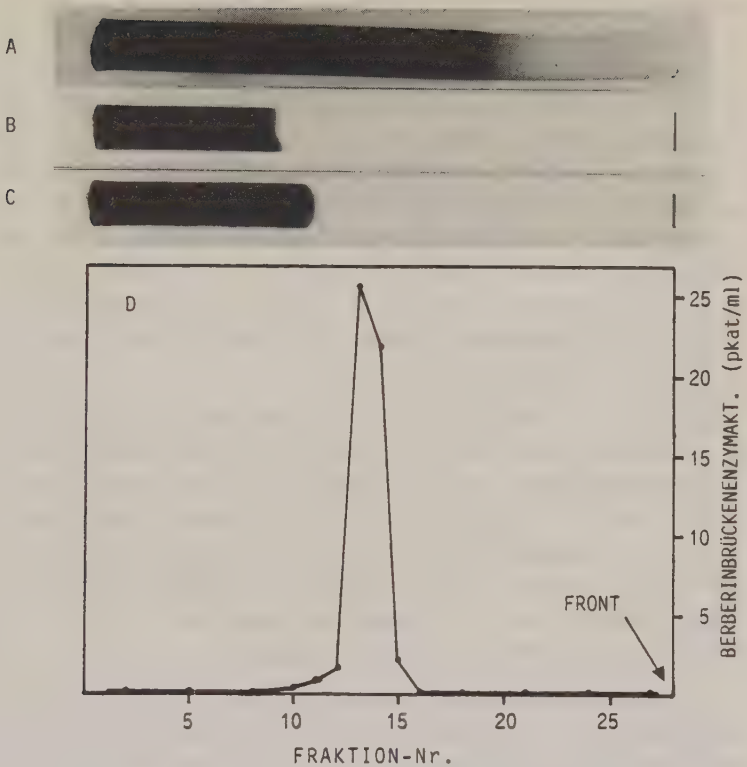


Abb. 20: Disc-elektrophoretische Auftrennung (verändert nach MAURER (1968); vgl. II.2.10.) eines 15-fach angereicherten Berberinbrückenenzym-Präparats aus *B. beaniana*-Zellkultur (Phenyl-Sepharose-Eluat; vgl. III.5.5.). Die zylindrischen Standardgele (Trenngel: 9 % Polyacrylamid) waren mit je 650 μ g Protein beladen worden. Die Gele A-C wurden mit den unter II.2.10. angegebenen Methoden angefärbt. Gel A zeigt die Proteinverteilung, Gel B die der Peroxidase-Aktivität und Gel C diejenige Fe-haltiger Proteine. Die Aktivitätsverteilung des Berberinbrückenenzym im fraktionierten Eluat des Gels D wurde mit der in Abb. 17 angegebenen Methode bestimmt (Fraktionsvolumen: cdf. 380 μ l).

pH-Gradient ausgebildet ist. Solche pH-Gradienten werden mit synthetischen, niedermolekularen Polyampholyten hergestellt, die hohe Pufferkapazitäten besitzen und sich unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes gemäß ihren isoelektrischen Punkten anordnen. Appliziert man ein Protein einem solchen System, so wandert es seiner Ladung entsprechend zur entgegengesetzt geladenen Elektrode, bis es die Stelle des pH-Gradienten erreicht hat, an der es keine Nettoladung mehr trägt. Der pH-Wert, der an dieser Stelle vorliegt, definiert den isoelektrischen Punkt des Proteins; diese charakteristische Eigenschaft bildet den Trennparameter der isoelektrischen Fokussierung.

Die Fraktionierung des elektrophoretisch vorgereinigten Berberinbrückenenzym-Präparates mit dieser Reinigungsmethode zeigt Abb. 21. Auch in diesem Anreicherungsschritt wurden noch erhebliche Proteinmengen abgetrennt (ca. 90 %; vgl. auch Abb. 22). Die Ausbeute an Enzymaktivität betrug 25 %, der Anreicherungsfaktor war 3,1 (vgl. Tab. 7). der isoelektrische Punkt des Berberinbrückenenzym wurde zu 4,9 bestimmt (vgl. III.6.5.).

Die SDS-elektrophoretische Analyse zeigte, daß das so angereicherte Berberinbrückenenzym frei von Fremdprotein war (vgl. III.5.8.). Tab. 7 gibt eine Übersicht der einzelnen Schritte der Reinigungsprozedur, mit der diese Präparation gewonnen wurde. Bei einer Ausbeute an Enzymaktivität von 0,7 % wurde ein Anreicherungsfaktor von 440 erzielt. Bei der Beurteilung dieser Werte muß berücksichtigt werden, daß - wie schon erwähnt - die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase im verwendeten Testsystem interferiert. Die Meßwerte für die Aktivität des Berberinbrückenenzym gewinnen daher in dem Maß an Glaubwürdigkeit, in dem die Abtrennung der Störaktivität gelang.

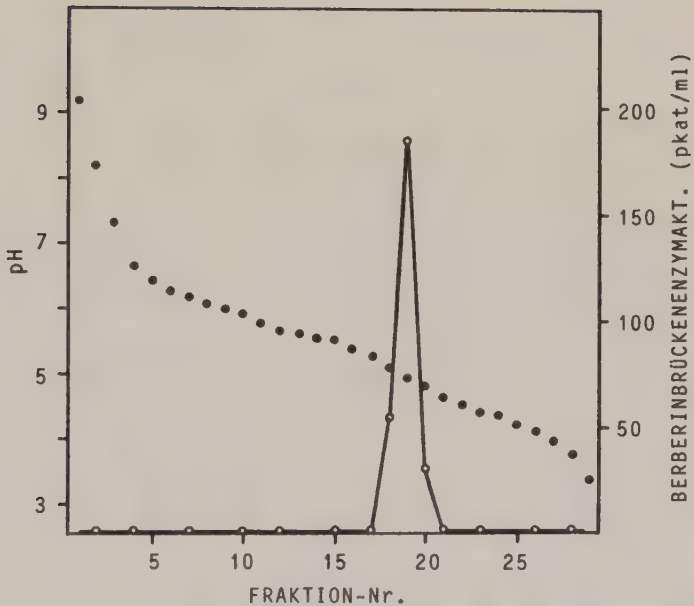


Abb. 21: Fraktionierung des elektrophoretisch vorgereinigten Berberinbrückenenzym (140 µg Protein in ca. 750 µl 5 mM Phosphatpuffer, pH 7,5; vgl. III.5.6.) durch isoelektrische Fokussierung in einem zylindrischen Standardgel (vgl. II.2.10). Das segmentierte Gel wurde mit H₂O extrahiert. Nach der Bestimmung des pH-Wertes und der Enzymaktivität (mit der in Abb. 17 angegebenen Methode) wurde das Eluat (400 µl/Fraktion) gegen Standardpuffer dialysiert.

Tab. 7: Anreicherung des Berberinbrückenenzym aus *B. bea-niana*-Zellkultur. In der letzten Spalte ist die Abtrennung der im Testsystem interferierenden (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase dargestellt.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Gesamt- Aktivität (pkat)	spez. Aktivität (pkat/mg)	Aus- beute (%)	Anrei- cherung (x-fach)	Ges.-Akt. (S)-TH-Proto- berberin-Ox. (pkat)
Rohextrakt (dialysiert)	435	726	10530	14,5	100	1	13550
CM-Sepharose- Filtrat	430	478	8580	17,9	81	1,2	14270
Aktivkohle- Filtrat	540	387	7720	19,9	73	1,4	12450
DEAE-Sephacel-I- Eluat	39,0	145	10270	70,8	98	4,9	7560
AcA-54- Eluat	147	32,7	1810	55,4	17,2	3,8	200
DEAE-Sephacel-II- Eluat	41,5	11,5	1780	155	16,9	10,7	8,4
Ultrafiltr. Phenyl- Sepharose-Eluat	0,85	3,91	868	222	8,2	15,3	2,2
Disk-Elektro- phorese-Eluat	0,75	0,14	294	2100	2,8	145	0
Isoel. Fokuss.- Eluat	0,50	0,011	73,5	6420	0,70	440	0

5.8. Dokumentation des Anreicherungsverfahrens und der Homogenität des gereinigten Berberinbrückenenzym durch SDS-Gelelektrophorese

Eine rein analytische Methode zur Untersuchung proteinhaltiger Proben ist die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Dieses anionische Detergenz hat die Eigenschaft, sich mit seinem hydrophoben Molekülteil an Proteine anzulagern. Dadurch wird ihre Tertiärstruktur zerstört; aus Untereinheiten zusammengesetzte Proteine werden in ihre Bestandteile zerlegt. Eine zusätzliche Behandlung der Analysenlösung mit reduzierenden Reagenzien (z.B. β -MSH) führt zur Aufspaltung von Disulfidbrücken innerhalb der oder zwischen den Polypeptidketten. Das Resultat dieser Behandlung sind zufällig geknäulte, denaturierte Proteine bzw. deren dissoziierte Untereinheiten. Von ihrer Molekülgröße direkt abhängig ist die Menge an adsorbiertem Natrium-Dodecylsulfat; d.h. alle Proteine erhalten durch dieses Reagenz eine identische Ladungsdichte (die Protein-eigenen Ladungen werden dabei völlig überdeckt). Dadurch wird das Molekulargewicht der Proteine zur einzig bestimmenden Größe für die Geschwindigkeit ihrer Wanderung durch das Gel (WEBER und OSBORN, 1969). Aus diesem Grund hat sich die SDS-Gelelektrophorese zu einer verbreiteten Methode zur Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen entwickelt. Aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens wird sie darüber hinaus - meist in Kombination mit anderen Trenntechniken - häufig zur Demonstration der Homogenität von Proteinpräparaten herangezogen.

Die Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte in der Anreicherung des Berberinbrückenenzym (III.5.2.-III.5.7.) wurde mit einem diskontinuierlichen SDS-Gelsystem

(nach LAEMMLI, 1970, und LAEMMLI und FAVRE, 1973) überprüft. Wie aus Abb. 22 hervorgeht, gelang die Isolierung eines aktiven Enzympräparats, das in dem verwendeten Gelsystem eine einzige Bande bildete. Dieser Befund ist vor allem insofern signifikant, als das Trennprinzip der präparativ benutzten isoelektrischen Fokussierung ein anderes ist als dasjenige der SDS-Elektrophorese, die anschließend für die Analytik verwendet wurde. Durch die Kombination dieser beiden hochauflösenden Methoden kann aus dem Auftreten von nur einer Bande im SDS-Gel geschlossen werden, daß das Berberinbrückenenzym bis zur Homogenität gereinigt wurde.

Als diskrete Bande im SDS-Gel wird das Berberinbrückenenzym erst in den späten Reinigungsphasen sichtbar, nämlich nach der zweiten Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepacel (Abb. 22). Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem extrem geringen Anteil, den das gereinigte Enzympräparat an der Gesamtproteinmenge einnimmt (0,0017 %; vgl. Tab. 7). Die Befunde zeigen, daß das Berberinbrückenenzym nicht zu den prominenten Proteinen in der B. beaniana-Zellkultur zählt, was nicht weiter erstaunlich für ein Enzym des Sekundärstoffwechsels ist.

Ein Vergleich der relativen Beweglichkeit des homogenen Enzympräparats mit der einiger Referenzproteine im SDS-Gel zeigt, daß das Berberinbrückenenzym ein Molekulargewicht von 54,5 kD besitzt (vgl. Abb. 22; III.6.6.). Basierend auf diesem Molekulargewicht, berechnet sich aus der spezifischen Aktivität des homogenen Enzyms, die unter den optimierten Standardbedingungen gemessen wurde (vgl. Tab. 7), eine Wechselzahl von 0,35 mol Substratumsatz/mol Enzym x Sekunde. Das ist ein vergleichsweise geringer Wert für diese charakteristische Enzym-Kenngröße; die Wechselzahlen der meisten Enzyme liegen im Bereich von 1 bis 10^4 mol Substratumsatz/mol Enzym x Sekunde (STRYER, 1981). Allerdings muß bei der Beurteilung dieses Resultats berücksich-

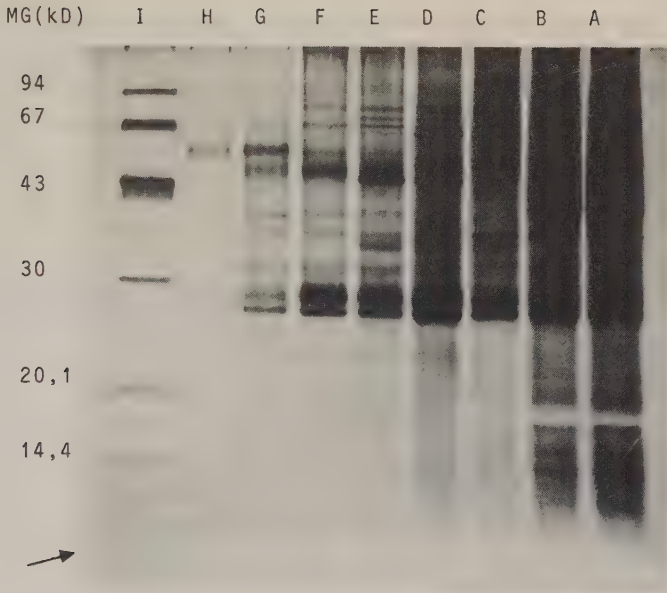


Abb. 22: Elektrophoretische Auftrennung von Proben der einzelnen Anreicherungsstadien des Berberinbrückenzyms aus *B. beaniana*-Zellkultur in einem diskontinuierlichen, denaturierenden Gelsystem nach LAEMMLI (1970) und LAEMMLI und FAVRE (1973). A: Rohextrakt (28 µg Protein); B: nach Behandlung mit CM-Sepharose und Aktivkohle (23 µg); C: DEAE-Sepharose-I-Eluat (14 µg); D: Ultrogel AcA 54-Gelfiltrations-Eluat (14 µg); E: DEAE-Sepharose-II-Eluat (9 µg); F: Phenyl-Sepharose-Eluat (7 µg); G: Eluat der präparativen Disc-Elektrophorese (3 µg); H: Eluat der isoelektrischen Fokussierung (0,7 µg); I: Referenzproteine: Phosphorylase b (MG: 94 kD), Albumin (67), Ovalbumin (43), Kohlen-säure-Anhydratase (30), Trypsin-Inhibitor (20,1), α -Lactalbumin (14,4) (je 1,5 µg). Den Start bildet der obere Bildrand, die (etwas konkave) Front kennzeichnet der Pfeil. Das Gel wurde nach der Silberfärbemethode (modifiziert nach MORRISSEY, 1981) angefärbt.

tigt werden, daß das Testsystem, mit dem die Enzymaktivität bestimmt wurde, einen primären Isotopeneffekt bei der gemessenen Reaktion impliziert (vgl. III.6.2.). Daher stellt das ermittelte Ergebnis lediglich einen Minimalwert dar.

6. Charakterisierung des Berberinbrückenenzyms

Mit den Arbeiten zur Anreicherung des Berberinbrückenenzym einher gingen Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzyms. Wie im einzelnen genannt, wurden die meisten Experimente mit hoch angereicherten, elektrophoretisch gereinigten Präparationen durchgeführt, in denen weder (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-, Katalase- noch Peroxidase-Aktivität nachweisbar war. Die erste Fragestellung, die in diesem Zusammenhang beantwortet werden mußte, war die nach der Identität des Produktes, das das angereicherte Enzym aus Retikulin bildet.

6.1. Produktidentifizierung

RINK und BÖHM (1975) identifizierten Scoulerin als Umsetzungsprodukt des Berberinbrückenenzym, das sie aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isoliert hatten. Den Identitätsbeweis führten sie folgendermaßen:

1. Das Reaktionsprodukt comigrierte in 3 Dünnschicht-Chromatographiesystemen mit authentischer Referenzsubstanz.
2. Eine bathochrome Verschiebung des UV-Spektrums in alkalischer Lösung zeigte den phenolischen Charakter des Enzymprodukts.
3. Permethyliertes, radioaktives Enzymprodukt zeigte in 4 Laufmittelsystemen übereinstimmende R_f-Werte mit Tetrahydropalmatin. Zusammen mit dieser Referenzsubstanz ließ es sich zu konstanter spezifischer Radioaktivität umkristallisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Produkt des aus B. beaniana-Zellkultur isolierten Enzyms zweifelsfrei identifiziert werden. Besonderer Wert wurde hierbei auf die Unterscheidung zwischen zwei isomeren Verbindungen gelegt, die durch eine unterschiedliche Ausbildung der Berberinbrücke aus Retikulin entstehen können, nämlich Scoulerin und Coreximmin (Abb. 23). Beide Substanzen sind aus Pflanzen isoliert worden, die der Familie der Papaveraceae angehören: Scoulerin (u.a.) aus mehreren Vertretern der Gattungen Corydalis und Glaucium, Coreximmin aus Dicentra eximia (vgl. MANSKE und ASHFORD, 1954; JEFFS, 1967). Vor diesem Hintergrund schien die Klärung der Frage wichtig, welches der beiden Alkaloide (bzw. ob überhaupt eines ausschließlich) von dem isolierten Enzym aus dem Substrat Retikulin gebildet wird. Zu diesem Zweck wurden 36,5 mg (R,S)-Retikulin-HCl (0,1 mmol) mit 50 mmol Glycin/NaOH-

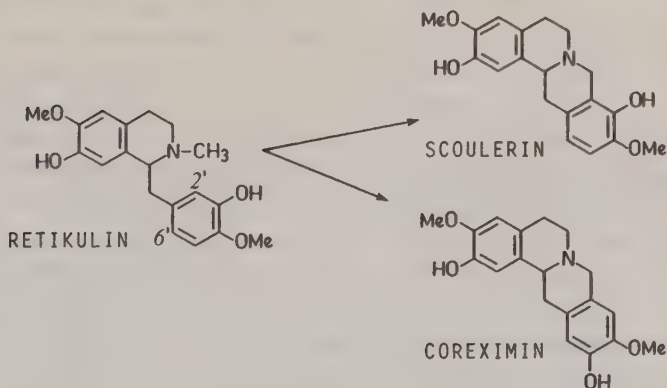


Abb. 23: Zwei alternative Möglichkeiten der Berberinbrückenbildung. Verknüpfung der N-Methylgruppe des Retikulins mit C2' führt zu Scoulerin, mit C6' zu Coreximmin.

Puffer, pH 8,9, und 520 pkat (2,3 mg Protein) Berberinbrückenenzym in einem Ansatz von 1 Liter Volumen bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem verwendeten Enzympräparat handelte es sich um das dialysierte Eluat der hydrophoben Chromatographie an Phenyl-Sepharose (vgl. III.5.5.). Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 5; R_f (Retikulin) = 0,65; R_f (Scoulerin) = 0,80; R_f (Corexim) = 0,70). Innerhalb von 4 Tagen wurden etwa 50 % des Retikulins zu einem Produkt umgesetzt, das in dem verwendeten Laufmittelsystem denselben R_f -Wert wie authentisches Scoulerin besaß; Corexim wurde nicht gebildet. Eine weitere Umsetzung des raze-mischen Substrats wurde nicht beobachtet; dieser Befund steht in Einklang mit der schon berichteten absoluten Stereoselektivität des Enzyms (vgl. III.2.). Der Ansatz wurde mit Chloroform extrahiert, der Rückstand der vereinigten organischen Phasen dünnschichtchromatographisch gereinigt (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 5; s.o.). Das gereinigte Enzymprodukt (5,6 mg) zeigte dünnschichtchromatographisch in den Laufmittelsystemen 7 und 10 (vgl. II.2.9.; R_f (Scoulerin) = 0,55 bzw. 0,60) mit Scoulerin übereinstimmende R_f -Werte; in dem unter II.2.9. beschriebenen HPLC-System besaß es eine Retentionszeit, die mit der von Scoulerin identisch war (3,70 min.; vgl. III.6.7.). Sein UV-Spektrum entsprach dem authentischer Referenz (UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}} = 283 \text{ nm}$; $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}} = 252 \text{ nm}$; vgl. II.2.1.2.). Die massenspektrometrische Analyse eines 20 μg -Aliquots zeigte das für Scoulerin charakteristische Fragmentierungsmuster (vgl. BATTERSBY *et al.*, 1966; CHEN und MACLEAN, 1968). Es stimmte mit dem authentischer Referenzsubstanz völlig überein (Tab. 8, Abb. 24 A). Ein weiteres 20 μg -Aliquot des Enzymprodukts wurde mit Essigsäureanhydrid in Pyridin ($v/v = 1/1$; Gesamtvolumen: 10 μl) zum 2,9-diacetylierten Derivat umgesetzt; sein Massenspektrum war mit dem entsprechend behandelte Referenzsub-

Scoulerin			diacetyliertes Scoulerin		
Masse (m/z)	rel. Intensität (%)		Masse (m/z)	rel. Intensität (%)	
	Referenz	Enzym- produkt		Referenz	Enzym- produkt
106	12,32	12,14	107	13,65	13,74
107	29,07	29,25	121	10,33	10,48
121	10,36	10,88	135	16,61	16,57
135	26,89	27,00	149	26,96	27,18
149	14,67	16,74	150	100,00	100,00
150	48,28	49,97	151	23,57	22,01
151	13,91	14,75	176	23,08	22,35
162	10,25	10,20	177	10,01	10,07
163	15,27	15,96	352	19,64	19,41
176	35,89	35,84	410	15,47	14,16
177	36,87	37,99	411	18,36	17,67
178	100,00	100,00			
326	27,93	25,32			
327	39,22	37,57			

Tab. 8: Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierung authentischen (S)-Scoulerins und des Enzymprodukts bzw. der jeweiligen diacetylierten Derivate als Beweis für die Identität des Enzymprodukts als Scoulerin.

stanz identisch (Tab. 8, Abb. 24 B).

Das ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz; CDCl_3) des Enzymprodukts zeigte die für Scoulerin zu erwartende chemische Verschiebung der Signale für H-1 ($\delta = 6,82$ ppm), H-4 ($\delta = 6,60$ ppm), H-11 und H-12 ($\delta = 6,71$ ppm) (OHIRI et al., 1983). Das Fehlen der für Coreximmin charakteristischen Signale bei $\delta = 6,56$ ppm (H-12) und $\delta = 4,05$ ppm (H₂-8) (OHIRI et al., 1983)

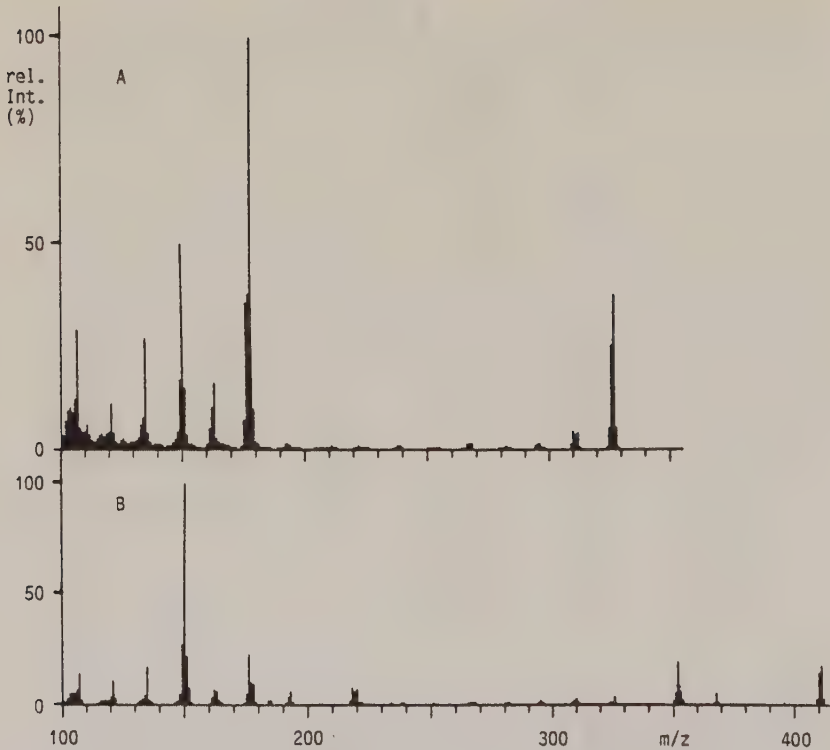


Abb. 24: Massenspektren des Enzymprodukts des angereicherten Berberinbrückenenzym aus *B. beaniana*-Zellkultur (A) bzw. seines acetylierten Derivats (B). Das Fragmentierungsmuster stimmte mit dem authentischen Scoulerins bzw. 0,0-Diacetylscoulerins exakt überein (vgl. Tab. 8).

bestätigte erneut, daß ausschließlich Scoulerin dasjenige Tetrahydroprotoberberin ist, das vom Berberinbrückenenzym aus *B. beaniana*-Zellkultur gebildet wird.

Die optische Reinheit des enzymatisch dargestellten Scoulerins wurde polarimetrisch bestimmt: $[\alpha]_D^{23} = -272^\circ$ ($c = 0,0056$ in Methanol). Dieser Drehwert stimmt mit Literaturangaben für (S)-Scoulerin (BATTERSBY et al., 1966; $[\alpha]_D^{28} = -283^\circ, -289^\circ$) soweit überein, daß das Enzymprodukt eindeutig als das (S)-Enantiomer des Scoulerins angesprochen werden kann.

Die zweifelsfreie Identifizierung des Enzymprodukts als (S)-Scoulerin bestätigte die Natur der Enzymreaktion, die bislang aufgrund der Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC³H₃)-Retikulin nur vermutet werden konnte. Sie lieferte erst den unmittelbaren Beweis, daß es sich bei der untersuchten Enzymaktivität tatsächlich um die des Berberinbrückenenzym handelte.

6.2. Cofaktorabhängigkeit, Stöchiometrie und Isotopeneffekt der Berberinbrückenenzym-Reaktion

Die Untersuchungen des aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym hatten gezeigt, daß es keine Cofaktoren für die Entfaltung seiner katalytischen Aktivität benötigt: NAD, NADP, NADH, NADPH, Glutathion (reduziert und oxidiert), FAD und Ascorbinsäure hatten keinen Einfluß auf die Enzymreaktion (RINK und BÖHM, 1975). Andererseits wurde Retikulin nur in Gegenwart von molekularem Sauerstoff zu Scoulerin umgesetzt; seine Anwesenheit war durch keinen der genannten Cofaktoren zu ersetzen (RINK und BÖHM, 1975). Diese Befunde deuteten auf eine Funktion molekularen Sauerstoffs als Akzeptor der Reduktionsäquivalente hin, die bei der Oxidation des Retikulins zu Scoulerin freigesetzt werden. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden die im folgenden geschilderten Experimente mit dem aus B. beaniana-Zellkultur isolierten Enzym als Katalysator durchgeführt.

Der Einfluß oxidierter Cofaktoren auf die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Berberinbrückenbildung wurde im Tritium-Ausbaute test ermittelt. Die Inkubationsansätze enthielten (abweichend vom Standard-Testverfahren) in einem Volumen von 0,25 ml 20 µmol Tris/HCl-Puffer, pH 8,4, 255 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (180 Ci/mol), 0,031 pkat Berberinbrückenenzym (Eluat der zweiten DEAE-Ionenaustauschchromatographie; vgl. III.5.4.; entsprechend 0,20 µg Protein) und je 0, 20 bzw. 200 nmol NAD, NADP, FAD bzw. FMN (als Natrium-Salze). Inkubation und Analyse der Ansätze erfolgten nach der unter III.1.4. beschriebenen Methode. In Übereinstimmung mit den von RINK und BÖHM (1975) berichteten Resultaten konnte keinerlei Effekt der untersuchten Pyridinnukleotide auf die Umsatzrate festgestellt werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob molekularer Sauerstoff stöchiometrisch an der Gesamtreaktion des Berberinbrücken-enzym s beteiligt ist, wurden kinetische Messungen der Sauerstoffkonzentration in Inkubationsansätzen durchgeführt, deren Zusammensetzung hinsichtlich der Substratart und -menge variierte. Als Enzympräparat wurde in diesen Experimenten ausschließlich elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrückenenzym verwendet (vgl. III.5.6.). Abb. 25 zeigt die zeitliche Änderung der Sauerstoffkonzentration in verschiedenen Testansätzen. Es wurde eine Abnahme der Konzentration an gelöstem Sauerstoff registriert, deren Ausmaß eindeutig und direkt-proportional von der eingesetzten Menge an (S)-Retikulin als Substrat abhing. Sie war einer noch unverständenen, Substrat-unabhängigen Sauerstoffverarmung (Ansatz A) überlagert, von der sie aufgrund ihrer deutlich höheren Geschwindigkeit jedoch leicht unterschieden werden konnte. Unter Berücksichtigung dieser unspezifischen Sauerstoff-Verbrauchsrate wurden pro mol (S)-Retikulin 0,86 (B), 0,94 (C) und 0,90 (D) mol O₂ verbraucht. Die weitaus plausibelste Interpretation dieser Resultate

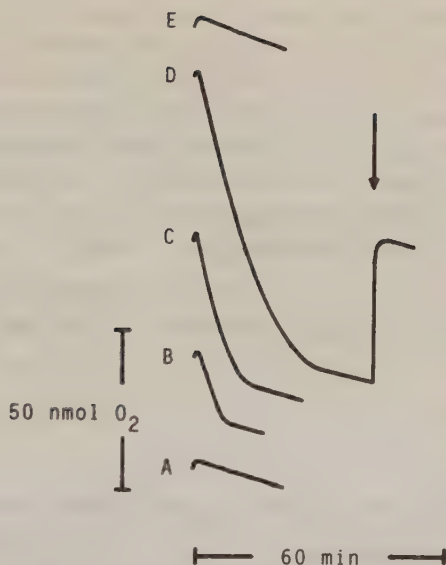


Abb. 25: Kinetische Messung des Sauerstoffverbrauchs in Inkubationsansätzen, die in einem Volumen von 0,8 ml 40 μ mol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 5,0 pkat elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrückenenzym ($\approx$ 29 μ g Protein; vgl. III.5.6.), und (A) 0, (B) 23, (C) 46, (D) 92 nmol (S)-Retikulin-HCl bzw. (E) 46 nmol (R)-Retikulin-HCl enthielten. Ansatz D wurde nach 43 min. Inkubationszeit mit 1,3 μ kat (1,15 μ g) Katalase (in 5 μ l H₂O) versetzt (Pfeil). Die Messungen erfolgten bei 26°C und einem Druck von 1013 mbar in einer Clark'schen Sauerstoffelektroden-Meßzelle (vgl. II.2.6.). Die Reaktion wurde durch Zugabe von temperiertem Enzym gestartet.

ist ein simultaner Verbrauch von Sauerstoff und (S)-Retikulin in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Darüberhinaus konnte die Entwicklung stöchiometrischer Men-

gen an H_2O_2 demonstriert werden: Ein Ansatz (D), der nach Abschluß der Enzymreaktion mit Katalase versetzt wurde, setzte annähernd die Hälfte (54 %) der zuvor verbrauchten Sauerstoffmenge wieder frei. Die Stereoselektivität des Berberinbrückenenzym wurde erneut durch den Befund unter Beweis gestellt, daß es mit (R)-Retikulin als Substrat lediglich eine Sauerstoff-Verbrauchsrate erzielte, die vom Blindeffekt nicht unterscheidbar war (Ansätze E und A).

Die vorstehend genannten Resultate ermöglichen folgende Formulierung der Gesamtreaktionsbilanz des Berberinbrückenenzym:

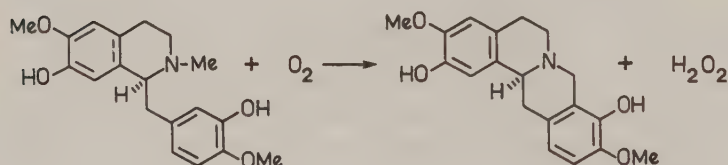


Abb. 26: Bilanz der Reaktion, die das hoch angereicherte Berberinbrückenenzym aus B. beaniana-Zellkultur katalysiert.

Zur Absicherung dieses Befundes wurden alle Parameter der Berberinbrückenenzym-katalysierten Reaktion parallel in direkt vergleichbaren Inkubationsansätzen kinetisch gemessen: Sauerstoff- und Retikulinverbrauch einerseits, H_2O_2 -, Scoulerinbildung und Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC 3 H $_3$)-Retikulin andererseits. Die Zusammensetzung und Inkubationsbedingungen der einzelnen Ansätze sind in Tab. 9 wiedergegeben. Ansatz A, der kontinuierlich gemessen wurde,

Ansatz	A	B	C	D	E
Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9	40 µmol	5 µmol	5 µmol	80 µmol	20 µmol
(S)-Retikulin	85 nmol	10,6 nmol	10,6 nmol	170 nmol	42,5 nmol
- (N ¹⁴ CH ₃)	---	---	178 nCi	---	---
- (NC ³ H ₃)	---	---	---	---	550 nCi
Enzymaktivität	5,0 pkat	0,625 pkat	0,625 pkat	10,0 pkat	2,5 pkat
≡ Proteinmenge	29 µg	3,6 µg	3,6 µg	58 µg	14,5 µg
Gesamtvolumen	800 µl	100 µl	100 µl	1600 µl	400 µl

Tab. 9: Zusammensetzung von Ansätzen zur kinetischen Bestimmung der einzelnen Parameter der Berberinbrückenenzym-Reaktion. Das als Katalysator benutzte Enzympräparat war elektrophoretisch gereinigt und frei von Katalase-Aktivität (vgl. III.5.6.). Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 26°C und 1013 mbar.

diente der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs. Die Messung wurde wie in Abb. 25 angegeben durchgeführt. Aus den Ansätzen B-E wurden nach 1-, 5-, 10-, 20-, 30-, 45-, 60- und 80-minütiger Inkubation 1/10-Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe eines entsprechenden Volumens einer 0,1 M KH₂PO₄-Lösung gestoppt (vgl. III.6.3.). Mit Ansatz B wurde der (S)-Retikulin-Verbrauch radioimmunologisch über den Gehalt der einzelnen Aliquots bestimmt (vgl. II.2.4.). Die Scoulerinbildung wurde in Ansatz C über die radiodünnschichtchromatographische Analyse der Aliquots ermittelt (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 5; R_f (Retikulin)= 0,65; R_f (Scoulerin)= 0,80). Ansatz D diente der Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Entwicklung, die colorimetrisch nach

GALLATI (1977) gemessen wurde (vgl. II.2.5.). Die Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC³H₃)-Retikulin wurde mit Ansatz E bestimmt. Die einzelnen Aliquots wurden mit H₂O auf 250 µl verdünnt und anschließend wie im Standardtest (vgl. III.1.4.) analysiert. Die Resultate der Experimente faßt Abb. 27 zusammen. Wie aus ihr hervorgeht, stimmten die verschiedenen Reaktionsparameter in ihrer Kinetik überein - mit einer Ausnahme: die Tritium-Freisetzung aus (S)-(NC³H³)-Retikulin erfolgte mit nur 61 % der Rate, mit der die übrigen Meßgrö-

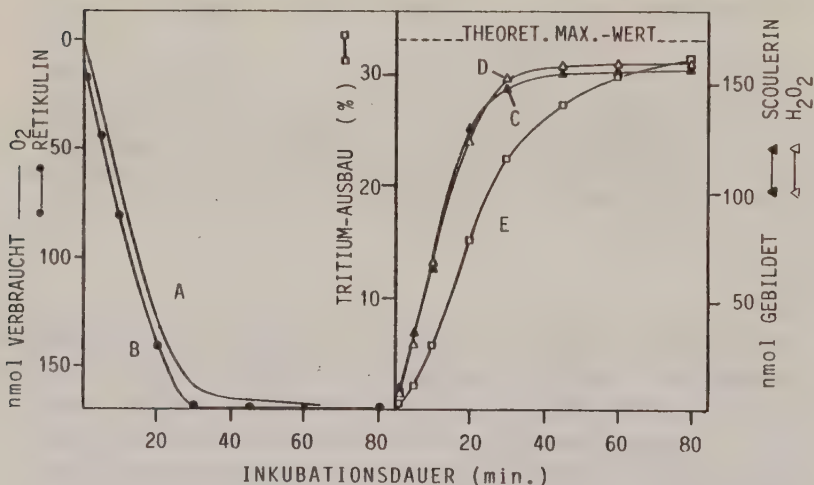


Abb. 27: Kinetik der einzelnen Parameter der Reaktion, die das aus *B. beaniana*-Zellkultur isolierte Berberinbrückenenzym katalysiert. Die Bezeichnungen der Ansätze A-E beziehen sich auf Tab. 9, in welcher auch deren Zusammensetzung angegeben ist. Die Ergebnisse sind auf die Dimension des Ansatzes D normiert dargestellt.

Ben ab- bzw. zunehmen. Eine einleuchtende Erklärungsmöglichkeit für diesen verlangsamten Tritium-Ausbau bietet die Annahme eines Isotopeneffektes; sie soll anschließend diskutiert werden. Die deckungsgleiche Kinetik der übrigen Parameter demonstriert eindeutig die stöchiometrische Beteiligung der gemessenen Größen an der Gesamtreaktion des Berberinbrückenenzym und liefert zusätzliche experimentelle Unterstützung für die in Abb. 26 formulierte Reaktionsbilanz.

Eine der Bindungen, die bei der Reaktion gelöst werden, ist diejenige zwischen dem N-Methyl-C-Atom des Retikulins und einem seiner Wasserstoffliganden. Ersetzt man dieses Wasserstoffatom durch sein Tritium-Isotop, wie dies in Ansatz E (vgl. Tab. 9), aber auch im Standard-Tritium-Ausbauteil geschah, so muß man dann eine verringerte Umsatzgeschwindigkeit erwarten, wenn die Spaltung der betreffenden Bindung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt (HOBERMAN und d'ADAMO, 1960). C-¹H-Bindungen werden häufig 10 bis 25-mal schneller als C-³H-Bindungen gespalten (SIMON, 1963), in erster Linie aufgrund ihrer unterschiedlichen Nullpunkt-Energien (LEWIS, 1976). Für den hier verzeichneten intermolekularen Isotopeneffekt wurde ein Wert von $K_H/K_T = 1,64$ bestimmt. Dieses Resultat besitzt jedoch nur für die angegebenen Versuchsbedingungen Gültigkeit; Isotopeneffekte können vom pH-Wert, der Substratkonzentration, der Ionenstärke des Mediums und weiteren Inkubationsparametern beeinflusst werden (SIMON und KRAUS, 1976). Insbesondere aufgrund dieser Nicht-Übertragbarkeit des Isotopeneffektes wird die Aussagekraft einiger Resultate relativiert, die im Tritium-Ausbauteil erzielt wurden (vgl. III.5.8., III.6.4., III.6.8.).

Einen intermolekularen Isotopeneffekt der biosynthetischen Berberinbrückenbildung hatten bereits (1975 a) BATTERSBY et al. in einem in vivo-Experiment demonstriert.

Sie fütterten eine Mischung aus (S)-(^{14}C 3)- und (S)-(N-Methyl- ^3H)-Retikulin an Chelidonium majus und isolierten das biosynthetisch gebildete Tetrahydroprotoberberin (S)-Stylopin. Dieses Produkt zeigte jedoch nicht das erwartete $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis (67 % des Isotopenverhältnisses des Substrates), sondern einen deutlich höheren Wert (107 %). Die Autoren interpretierten die signifikante Retention der Tritiummarkierung im Biosyntheseprodukt als Folge eines Isotopeneffekts bei der Ausbildung der Berberinbrücke. Diese Deutung steht in Einklang mit den hier berichteten Ergebnissen der in vitro-Untersuchung der fraglichen Reaktion.

6.3. pH-Optimum

Der pH-Wert bestimmt die Effektivität der enzymatischen Katalyse auf verschiedenerelei Weise: er beeinflusst einerseits die Proteinstruktur und den Dissoziationsgrad der Aminosäuren des Enzyms, andererseits die Ionisation, Proteinbindung und Reaktivität des Substrates (MAHLER und CORDES, 1971). Von der Gesamtheit dieser Einflüsse hängt das pH-Optimum ab, an dem die enzymkatalysierte Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit abläuft.

Die pH-Abhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion ist in Abb. 28 dargestellt. Die höchste Umsatzrate zeigte das aus B. beaniana-Zellkultur gewonnene Enzym bei pH 8,9 mit Glycin/NaOH-Puffer. Bei diesem pH-Wert liegt das Substrat praktisch ausschließlich in seiner ungeladenen Form, als freie Base vor. Möglicherweise verhindert die kationische Natur des Substrates in weniger alkalischem Milieu seine Bindung an einen hydrophoben Bereich des Enzyms.

RINK und BÖHM, die (1975) das pH-Optimum des aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isolierten Berberinbrück-

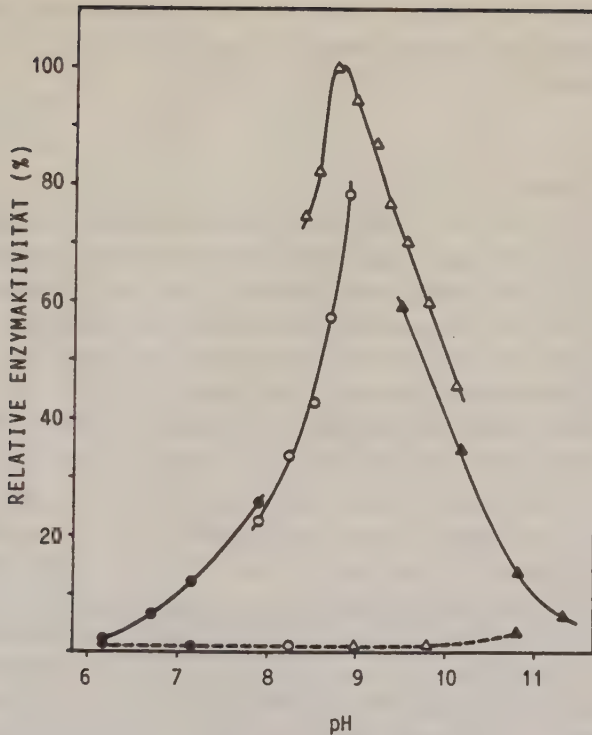


Abb. 28: pH-Abhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion, gemessen im Tritium-Ausbaute. Inkubationsansätze enthielten in 250 μ l Volumen 15 μ mol des jeweiligen Puffers, 255 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (180 Ci/mol) und 24 fkat elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrückenenzym ($\approx$ 12 ng Protein; vgl. III.5.6.) aus *B. beaniana*-Zellkultur. Inkubation und Analyse der Ansätze erfolgte wie unter III.1.4. beschrieben. ●—● KNa-Phosphat; ○—○ Tris/HCl; ▲—▲ Glycin/NaOH; ▲—▲ NaHCO₃/Na₂CO₃. Die unterbrochene Linie verbindet Kontrollansätze mit Hitze-inaktiviertem Enzym.

kenenzymys untersuchten, kamen zu signifikant abweichenden Resultaten. Für dieses Enzym registrierten sie einen optimalen pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,2.

6.4. Temperatur-Optimum

Die Temperaturabhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen beruht auf zwei gegenläufigen Einflüssen: zum einen steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur exponentiell an, zum anderen bewirkt die thermische Inaktivierung des Enzyms eine Verlangsamung der Reaktion. Diese beiden voneinander unabhängigen Faktoren führen zur Ausprägung eines Temperatur-Optimums, an dem die enzymatisch katalysierte Reaktion ihre maximale Geschwindigkeit erreicht.

Abb. 29 A zeigt die Temperaturabhängigkeit der Reaktion, die das hoch angereicherte Berberinbrückenenzym aus B. beaniana-Zellkultur katalysiert. Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion wurde unter den angegebenen Bedingungen im Bereich zwischen 40 und 50°C beobachtet; eine nur geringfügig weitere Erhöhung der Temperatur verursachte eine drastische Verringerung der Umsatzrate. Aus der Auftragung der Daten im Arrhenius-Diagramm (Abb. 29 B) wurde die Aktivierungsenergie der Reaktion zu 48,6 kJ/mol bestimmt (nach RAUEN, 1956), entsprechend einem Temperaturkoeffizienten (Q_{10} -Wert) von 1,9 im Intervall zwischen 20 und 30°C. Dieser Wert liegt im Rahmen der für enzymatische Reaktionen typischen Temperaturkoeffizienten (1,4 - 2,0; RAUEN, 1956). Bei der Wertung des Resultats muß jedoch berücksichtigt werden, daß es von einem primären Isotopeneffekt beeinflusst wird (vgl. III.6.2.), über dessen Ausprägung unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen keine experimentellen Daten vorliegen.

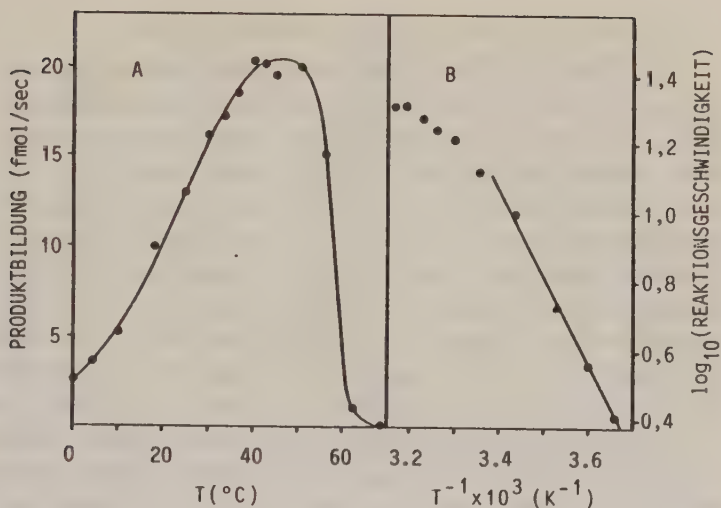


Abb. 29: Temperaturabhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion, gemessen im Tritium-Ausbaute. Inkubationsansätze enthielten in 250 μl Volumen 25 μmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 255 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (180 Ci/mol) und 17 fkat elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrückenenzym aus *B. beaniana*-Zellkultur ($\cong$ 8,2 ng Protein; vgl. III. 5,6.). Sie wurden nach 60-minütiger Inkubation bei 0, 4,5, 10, 18, 25, 30, 33,5, 37, 40, 42,5, 46,5, 50,5, 56, 62,5 und 69°C im Standardverfahren analysiert (vgl. III.1.4.). Abb. A zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur; in Abb. B sind dieselben Daten im Arrhenius-Diagramm dargestellt ($\log_{10}$ der Reaktionsgeschwindigkeit vs. reziproke absolute Temperatur) (nach RAUEN, 1956).

6.5. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym durch isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen wurde bereits in Kapitel III.5.7. beschrieben. Eine alternative Möglichkeit zur Bestimmung dieser charakteristischen Kenngröße von Proteinen ist die (1977) von SLUYTERMAN und WIJDENES eingeführte Methode der Chromatofokussierung. Dieses säulenchromatographische Trennverfahren besitzt gegenüber der erstgenannten Methode den Vorzug einer erheblich einfacheren Handhabung. Sein Trennprinzip besteht in der pH-abhängigen Elution von Proteinen, die an eine spezielle Anionenaustauschermatrix adsorbiert wurden, welche eine ausgeprägte Pufferkapazität in einem weiten pH-Bereich besitzt. Sie wird sukzessiv äquilibriert mit einem aus ampholytischen Substanzen zusammengesetzten Puffer, dessen pH-Wert unter dem isoelektrischen Punkt des interessierenden Proteins liegt. Dadurch bildet sich innerhalb der Ionenaustauschersäule ein pH-Gradient aus. Erreicht der pH-Wert des Elutionsmittels den isoelektrischen Punkt des Proteins, so verliert es seine negative Nettoladung, dissoziiert von der Matrix ab und wird eluiert. Sein isoelektrischer Punkt kann daher am pH-Wert des Eluats abgelesen werden.

Abb. 30 zeigt die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des angereicherten Berberinbrückenenzym. Er wurde sowohl mit der Methode der isoelektrischen Fokussierung als auch der Chromatofokussierung zu 4,9 bestimmt. Versuche, die Chromatofokussierung zur Anreicherung des Berberinbrückenenzym präparativ zu nutzen, scheiterten an den drastischen Aktivitätsverlusten (> 90 %), die bei der Anwendung dieses Verfahrens regelmäßig zu verzeichnen waren.

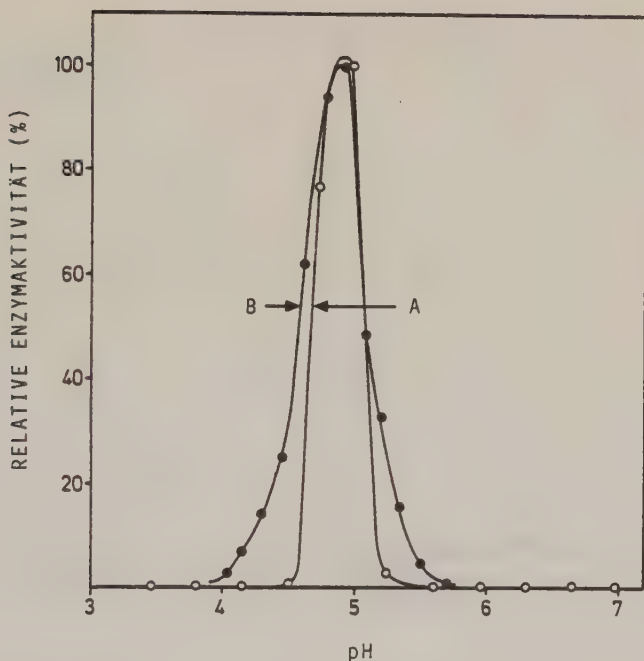


Abb. 30: Bestimmung des isoelektrischen Punktes des angereicherten Berberinbrückenenzym aus *B. beaniana*-Zellkultur; A: durch isoelektrische Fokussierung (Versuchsbedingungen: vgl. Abb. 21); B: durch Chromatofokussierung. Das durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration vorgereinigte Enzympräparat (10,2 pkat, 170 µg Protein) wurde gegen 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,8, dialysiert und auf eine Polybuffer 94-Exchanger-Säule (0,6 cm ø x 16 cm Höhe, äquilibriert mit Dialysepuffer) gepumpt. Elutionsmittel: 80 ml 1/8-verdünnter Polybuffer 74, mit HCl auf pH 4,0 titriert. Flußrate: 0,25 ml/min. Dargestellt (für beide Methoden) ist die relative Enzymaktivität des fraktionierten Eluats, gemessen im Standard-Tritium-Ausbaute, in Abhängigkeit von seinem pH-Wert.

6.6. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht des homogenen, denaturierten Berberinbrückenenzym aus B. beaniana-Zellkultur wurde SDS-gelelektrophoretisch zu 54,5 kD bestimmt (vgl. III.5.8.). Die Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen erlaubt die Methode der Gelfiltration (ANDREWS, 1964, 1965), die auch zur Reinigung des Berberinbrückenenzym verwendet wurde (vgl. III.5.3.). Bei diesem Verfahren wird die Elutionsgeschwindigkeit der Moleküle bestimmt von ihrer Fähigkeit, eine granuläre Matrix mit poröser Struktur zu durchdringen. Je kleiner das Protein ist, desto leichter (häufiger) diffundiert es in die Poren der Matrix und desto später wird es eluiert. Vergleicht man sein Elutionsverhalten mit dem von Referenzproteinen, so kann man Rückschlüsse auf sein Molekulargewicht ziehen. Voraussetzung ist, daß das fragile Protein eine annähernd globuläre Gestalt besitzt (COOPER, 1981); dann ist der eigentlich entscheidende Trennparameter, der Stoke'sche Radius, dem Molekulargewicht proportional.

In Abb. 31 A ist der Verteilungskoeffizient wiedergegeben, den das aus B. beaniana-Zellkultur isolierte Berberinbrückenenzym bei Gelfiltration an AcA 54 zeigt. Er entspricht einem Molekulargewicht von 48,5 kD. Dieser Wert weicht von dem Resultat der SDS-gelelektrophoretischen Bestimmung des Molekulargewichts ab (54,5 kD; Abb. 31 B). Diese Diskrepanz ist jedoch vermutlich nicht signifikant, da die Ergebnisse beider Methoden durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden können (vgl. COOPER, 1981). Als allgemein zuverlässiger gilt die SDS-Gelelektrophorese; die Gelfiltration wird normalerweise dann verwendet, wenn näherungsweise Bestimmungen genügen (NOZAKI et al., 1976). Aus der annähernden Übereinstimmung der Resultate, die mit der denaturierenden und der nicht-denaturierenden Methode

erzielt wurden, kann geschlossen werden, daß das Berberinbrückenenzym aus B. beaniana-Zellkultur aus einer einzigen Polypeptidkette besteht und nicht aus Untereinheiten zusammengesetzt ist.

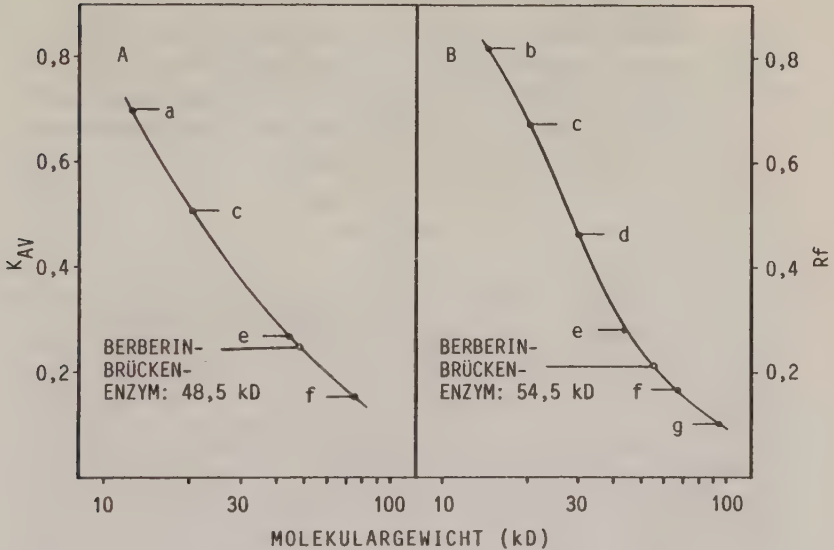


Abb. 31: Bestimmung des Molekulargewichts des aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym durch (A) Gelfiltration und (B) SDS-Gelelektrophorese. A: 3,0 pkat angereichertes Berberinbrückenenzym (Eluat der Phenyl-Sepharose-Säule, vgl. III. 5.5.; $\approx 15 \mu\text{g}$ Protein), 1,9 mg Cytochrom c (a; MG 12,5 kD), 4,2 mg Trypsin-Inhibitor (c; 20,1 kD), 4,0 mg Ovalbumin (e; 43 kD), 4,3 mg Rinderserumalbumin (f; 67 kD) und 3,3 mg Ferritin (480 kD; zur Bestimmung des Ausschlußvolumens) in 1,0 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, wurden an AcA 54 fraktioniert. Flußrate: 0,33 ml/min.; Elutionsmit-

tel: Probenpuffer. Die Referenzproteine wurden anhand ihrer UV-Absorption, das Berberinbrückenenzym durch seine katalytische Aktivität (gemessen im Standard-Tritium-Ausbaute) im Eluat nachgewiesen. Das Diagramm zeigt den Verteilungskoeffizienten $K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_T - V_0)$ der einzelnen Proteine, aufgetragen gegen ihre Molekulargewichte. V_e = Elutionsvolumen, V_0 = Ausschlußvolumen: 136 ml, V_T = Gelbettvolumen: 378 ml.

B: Rf-Werte des homogenen, denaturierten Berberinbrückenenzym (III.5.7., III.5.8.) und einiger Eichproteine im SDS-Gel, aufgetragen gegen ihre Molekulargewichte. Das Diagramm bildet die Auswertung des in Abb. 22 dargestellten SDS-Flachgels. Die zusätzlichen Eichproteine sind: α -Lactalbumin (b; MG 14,4 kD), Kohlensäure-Anhydratase (d; 30 kD), Phosphorylase b (g; 94 kD).

6.7. Substratspezifität

Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität beträchtlich. Die Ausprägung dieser Eigenschaft läßt sich feststellen, indem man die Geschwindigkeit vergleicht, mit der verschiedene potentielle Substrate durch das interessierende Enzym umgesetzt werden. Derartige Untersuchungen liefern nicht nur Hinweise auf die physiologische Funktion und Bedeutung des Enzyms, sondern unter Umständen auch auf den Reaktionsmechanismus. Beispielsweise können bestimmte strukturelle Gegebenheiten der Substratmoleküle sich als essentiell, andere dagegen als unerheblich erweisen.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität des aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym bestand ein Teilaspekt darin, die Metabolisierung von Retikulin-N-Oxid durch das angereicherte Enzym zu studieren. Diese Verbindung war (1954) erstmals von WENKERT als Intermediat der oxidativen N-Demethylierung des Retikulins vorgeschlagen worden, einer Reaktion, die bei der Entstehung der Tetrahydroprotoberberinalkaloide im tierischen Organis-

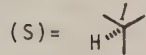
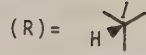
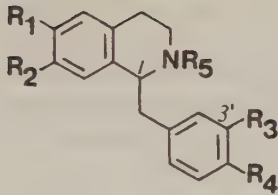
mus eine gewisse Rolle spielt (vgl. III.3.). BATTERSBY (1963) sah das N-Oxid des Retikulins als eine mögliche Zwischenstufe bei der Bildung der Methylen-Iminiumform an, welche er als unmittelbare Vorstufe der Protoberberinalkaloide postulierte (vgl. Abb. 4). Tatsächlich gelang es, die N-Oxide verschiedener Benzyl-Tetrahydroisochinolinalkaloide in biomimetischen Modellreaktionen zu Protoberberinen umzusetzen (BATHER et al., 1971; KAMETANI und IHARA, 1979). Darüber hinaus wurde Retikulin-N-Oxid als natürlich vorkommende Verbindung identifiziert; DASGUPTA et al. (1979) isolierten sie aus Blättern der Menispermaceae Pachygone ovata. Allerdings demonstrierten KAMETANI et al. (1980), daß Rattenleber-Microsomen-Präparationen (R,S)-Retikulin-N-Oxid nicht zu Protoberberinalkaloiden metabolisieren.

Die Darstellung der N-Oxide aus den optisch reinen Retikulinpräparaten wurde nach DASGUPTA et al. (1979) durchgeführt (vgl. II.2.1.3.). Chromatographie der Reaktionsansätze in Laufmittelsystem 11 (vgl. II.2.9.) zeigte jeweils zwei Produkte mit den Rf-Werten 0,45 (Produkt A) und 0,55 (B). Ihre Identität als diastereomere N-Oxid-Derivate ihrer jeweiligen enantiomeren Retikulin-Ausgangsverbindungen wurde exemplarisch für die C1-(S)-Stereoisomeren demonstriert. Sie zeigten identische UV-Spektren ($\lambda_{\max}^{\text{EtOH}} = 283 \text{ nm}$, $\lambda_{\min}^{\text{EtOH}} = 255 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}^{\text{EtOH, OH}^-} = 301 \text{ nm}$), die mit Literaturangaben übereinstimmten (DASGUPTA et al., 1979). Ihre Massenspektren zeigten bei chemischer Ionisation neben den für Retikulin typischen Fragmenten ($m/z = 330, 192$) charakteristische Molekularpeaks der Masse 346 (M^{+1} ; rel. Int.: A = 39 %, B = 9 %). Sie zeigten folgende spezifischen Drehwerte: A: $[\alpha]_D^{23} = 273^\circ$ ($c = 0,0026$ in Methanol); B: $[\alpha]_D^{23} = 61^\circ$ ($c = 0,0023$ in Methanol) (Konzentrationsbestimmung über UV ($\epsilon_{280}^{\text{EtOH}} = 6460 \text{ cm}^2/\text{mmol}$; DASGUPTA et al., 1979)). Aliquots beider Verbindungen wurden mit 5 %-iger schwefliger Säure reduziert (nach DASGUPTA et al., 1979); die Reaktion führte

in beiden Fällen zu Produkten, die sich dünnschichtchromatographisch wie Retikulin verhielten (vgl. II.2.9.; Laufmittelsystem 8; R_f (Retikulin) = 0,45) und massenspektrometrisch (chemische Ionisation) das für Retikulin charakteristische Fragmentierungsmuster zeigten.

Neben den N-Oxiden des Retikulins wurde eine Reihe weiterer, unterschiedlich substituierter Benzylisochinolinalkaloide daraufhin untersucht, ob sie durch das angereicherte Berberinbrückenenzym umgesetzt werden können (Abb. 32). Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene Analysemethoden herangezogen. Die Metabolisierung der Alkaloide wurde dünnschichtchromatographisch und durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Darüber hinaus gestattete die kinetische Untersuchung der H_2O_2 -Entwicklung in den Inkubationsansätzen einen Vergleich der Umsatzraten der einzelnen Substrate.

Die für die dünnschichtchromatographischen Analysen benutzten Testansätze enthielten in einem Volumen von 0,1 ml 10 μ mol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 70 nmol des betreffenden Alkaloid-Substrates und 8,8 pkat des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym (vgl. III.5.6.), entsprechend 5,7 μ g Protein. Nach 3-stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze gefriergetrocknet, die Rückstände in Methanol aufgenommen und in den Laufmittelsystemen 5, 6, 7 und 10 chromatographiert (vgl. II.2.9.; R_f (Retikulin) = 0,65, 0,65, 0,40 und 0,40; R_f (Scoulerin) = 0,80, 0,80, 0,55 und 0,60). Das Resultat der Analysen war eindeutig und stimmte in allen Chromatographiesystemen überein: Neben (S)-Retikulin wurde lediglich (S)-Protosinomenin und (R,S)-Laudanosolin durch das Berberinbrückenenzym umgesetzt. Während die beiden erstgenannten Substrate vollständig metabolisiert wurden, zeigte das racemische Laudanosolin nur einen annähernd 50 %-igen Umsatz. Alle übrigen Substrate (vgl. Abb. 32) zeigten in den verwen-



Substrat	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a) (S)-Retikulin-HCl	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃
b) (R)-Retikulin-HCl	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃
c) (S)-Retikulin-N-Oxid (A)	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃ ,0
d) (S)-Retikulin-N-Oxid (B)	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃ ,0
e) (R)-Retikulin-N-Oxid (A)	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃ ,0
f) (R)-Retikulin-N-Oxid (B)	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	CH ₃ ,0
g) (S)-Protosinomenin-HCl	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
h) (R)-Protosinomenin-HCl	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
i) (R,S)-Laudanidin	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	CH ₃
k) (R,S)-Laudanosolin-HBr	OH	OH	OH	OH	CH ₃
l) (R,S)-Laudanosin	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
m) (R,S)-Orientalin-HCl	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	CH ₃
n) (R,S)-Isoorientalin-HCl	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	CH ₃

Abb. 32: Tetrahydrobenzylisochinolin-Alkaloide, die als Substrate für das Berberinbrückenenzym getestet wurden. Die Angaben zur Stereokonfiguration beziehen sich auf das C-Atom 1; die Stereokonfiguration der Substrate c)-f) am Stickstoff ist unbekannt.

ten Chromatographiesystemen keinerlei Metabolisierung.

Die HPLC-Analysen wurden in Anlehnung an STABA et al. (1982) durchgeführt (vgl. II.2.9.). Die Trennung von Retikulin (Retentionszeit: 5,43 min.) und Scoulerin (3,70 min.) durch das verwendete Chromatographiesystem ist in Abb. 33 dargestellt. Als Probenlösungen dienten 20 µl-Aliquots von

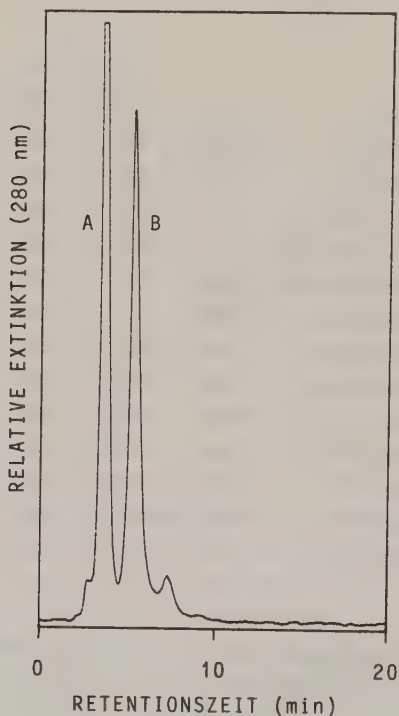


Abb. 33: Trennung von Scoulerin (A) und Retikulin (B) durch HPLC. Chromatographische Bedingungen vgl. II.2.9. (nach STABA et al., 1982).

Inkubationsansätzen, die in einem Volumen von 60 μl 3 μmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 30 nmol des jeweiligen Substrates und 1,2 μkat des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym (vgl. III.5.6.; entsprechend 100 ng Protein) enthielten. Die Ansätze waren nach 12-stündiger Inkubation bei 30°C mit 30 μl einer 1 M KH_2PO_4 -Lösung (als Stop-Reagenz; vgl. III.6.3.) versetzt worden. Ihre Fraktionierung durch das HPLC-System lieferte Elutionsprofile, die die Resultate der dünnschichtchromatographischen Analysen bestätigten: Neben (S)-Retikulin wurde ausschließlich (S)-Protosinomenin (Retentionszeit: 5,53 min.) umgesetzt; das Produkt, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um das entsprechend substituierte Tetrahydroprotoberberin handelt, besaß eine Retentionszeit von 3,64 min. Eine Überprüfung der Metabolisierung von (R,S)-Laudanosolin mit der hier genannten Analysenmethode gelang nicht aufgrund des untypischen chromatographischen Verhaltens dieser Verbindung. Die N-Oxide der beiden enantiomeren Retikuline (Substrate c-f, Abb. 32) wurden nicht untersucht.

Die Messung der H_2O_2 -Entwicklung bei der enzymkatalysierten Berberinbrückenbildung in Abhängigkeit von den eingesetzten Substraten wurde folgendermaßen ermittelt: Inkubationsansätze enthielten in einem Volumen von 800 μl 40 μmol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 100 nmol des jeweiligen Substrates und 2,6 μkat des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym (vgl. III.5.6.; entsprechend 16 μg Protein). Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden den Ansätzen 150 μl -Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zusatz von 170 μl 100 mM KH_2PO_4 -Lösung gestoppt. Unmittelbar anschließend wurde ihr H_2O_2 -Gehalt colorimetrisch nach der Methode von GALLATI (1977) bestimmt (vgl. II.2.5.). Die Resultate der Untersuchung standen in Einklang mit denen der chromatographischen Analysen: (S)-Retikulin, (S)-Pro-

tosinomenin und (R,S)-Laudanosolin waren die einzigen der in Abb. 32 aufgeführten Substrate, bei deren Inkubation mit dem angereicherten Berberinbrückenenzym eine Entwicklung von H_2O_2 verzeichnet werden konnte. Die Kinetik der Wasserstoffperoxidbildung bei der Metabolisierung dieser Substrate ist in Abb. 34 wiedergegeben. Wie aus ihr hervorgeht, wurde (S)-Protosinomenin geringfügig schneller umgesetzt, als das als physiologisches Substrat etablierte

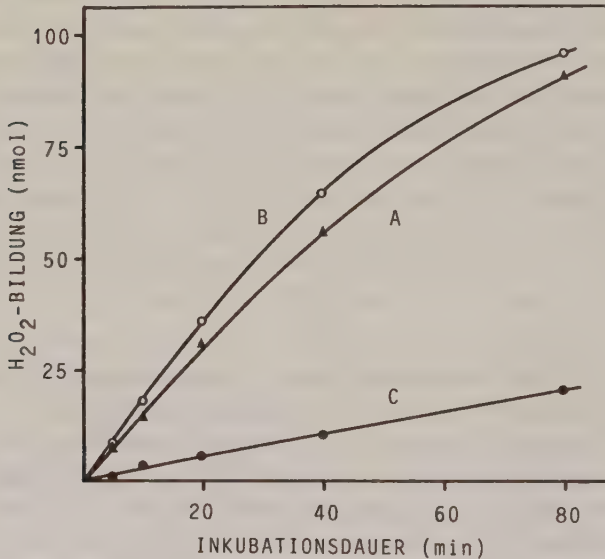


Abb. 34: Kinetik der Wasserstoffperoxidentwicklung bei der Metabolisierung von (S)-Retikulin (A), (S)-Protosinomenin (B) und (R,S)-Laudanosolin (C) durch hoch angereichertes Berberinbrückenenzym aus *B. beaniana*-Zellkultur. Die experimentellen Bedingungen sind im Text angegeben.

(S)-Retikulin. Dagegen wurde (R,S)-Laudanosolin nur vergleichsweise langsam metabolisiert, nämlich mit etwa 20 % der Umsatzrate, die mit (S)-Retikulin als Substrat verzeichnet wurde.

Die ausschließliche Metabolisierung des (S)-Enantiomers des Protosinomenins bestätigte erneut die Stereoselektivität des Berberinbrückenenzym.

Die N-Oxide des Retikulins erwiesen sich als untaugliche Substrate für das Berberinbrückenenzym, unabhängig davon, welche Stereokonfiguration an den beiden chiralen Zentren C1 und N (vgl. Abb. 32) vorlag. Dieser Befund kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß sie keine Zwischenstufe bei der Ausbildung der postulierten intermediären Methyleniminiumform bilden (vgl. Abb. 4).

Laudanidin (Substrat i; Abb. 32) war von BÖHM und RINK (1975) als geeignetes Substrat für das aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isolierte Berberinbrückenenzym beschrieben worden. Die Autoren interpretierten diesen Befund als Hinweis auf den essentiellen Charakter der 3'-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der Berberinbrücke. Auch die Resultate der vorliegenden Arbeit stehen mit dieser Annahme in Einklang: alle metabolisierten Substrate, Retikulin, Protosinomenin und Laudanosolin, besitzen die 3'-Hydroxylfunktion (vgl. Abb. 32). Allerdings wurde Laudanidin, das ebenfalls diese funktionelle Gruppe aufweist, von dem aus B. beaniana-Zellkulturen gewonnenen Berberinbrückenenzym nicht umgesetzt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich dieses Enzym von dem aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym (BÖHM und RINK, 1975). Möglicherweise ist für seine katalytische Aktivität die 3'-Hydroxylgruppe der Benzyloisochinolinalkaloide eine notwendige, offensichtlich jedoch keine ausreichende Bedingung.

6.8. Substratabhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion

Enzym-katalysierte Reaktionen unterscheiden sich von nicht-katalysierten Reaktionen durch eine charakteristische Abhängigkeit ihrer Anfangsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Eine Erhöhung der Substratkonzentration verursacht zunächst eine proportionale Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit; überschreitet die Reaktionsgeschwindigkeit einen bestimmten Wert, so nimmt die Beschleunigung der Umsatzrate allmählich ab, bis die Geschwindigkeit schließlich einen konstanten Maximalwert erreicht. MICHAELIS und MENTEN (1913) interpretierten dieses kinetische Phänomen mit der Bildung eines intermediären Enzym-Substrat-Komplexes während der Katalyse. Ausgehend von dieser Vorstellung formulierten sie die nach ihnen benannte Gleichung

$$v = \frac{v_{\max} \times \{S\}}{K_m + \{S\}} ,$$

die die Reaktionsgeschwindigkeit v als Funktion der Substratkonzentration $\{S\}$ ausdrückt. $v_{\max}$ ist die maximale Umsatzrate, die unter definierten Bedingungen bei unendlich hoher Substratkonzentration erreicht wird, K_m , die Michaelis-Konstante, der Quotient aus den Zerfalls- und Bildungskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes (nach BRIGGS und HALDANE, 1925). Die praktische Bedeutung dieser Größe besteht darin, daß sie die Substratkonzentration angibt, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

Der durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschriebenen Kinetik gehorchen unter gewissen Voraussetzungen auch Reaktionen mit mehr als einem Substrat. Untersucht man die

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des einen Substrats, so muß das komplementäre Substrat in einer Konzentration vorliegen, die seinen K_m -Wert wesentlich übersteigt (MICHAL, 1977).

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion von der Konzentration an (S)-Retikulin wurde im Tritium-Ausbaute test untersucht. Die Inkubationsansätze enthielten in einem Volumen von 250 μ l 25 μ mol Glycin/NaOH-Puffer, pH 8,9, 13 fkat elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrückenenzym (vgl. III.5.6.; entsprechend 7,1 ng Protein), 6,4 pmol ($\cong$ 46 nCi) (S)-(NC³H₃)-Retikulin und zwischen 12,5 pmol und 1,25 nmol (S)-Retikulin-HCl. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C; aus ihr berechnet sich eine O₂-Konzentration von 224 μ M. Für jede Substratkonzentration wurde die Zeitabhängigkeit der Reaktion bestimmt. Dabei wurden die Inkubationszeiten so gewählt, daß maximal ein etwa 10 %-iger Umsatz erzielt wurde. Die Analyse der Testansätze erfolgte im Standardverfahren (vgl. III.1.4.). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigt Abb. 35.

Die Enzymreaktion zeigte eine normale Michaelis-Menten-Kinetik. Aus der Auftragung der Daten in linearisierter Form nach LINEWEAVER und BURK (1934) läßt sich ein K_m -Wert für (S)-Retikulin von 0,14 μ M und eine Maximalgeschwindigkeit von 17 fmol/Sekunde ableiten. Die Verwendung des Tritium-Ausbaute tests als analytisches Verfahren beschränkt die Aussagekraft dieser Resultate jedoch auf die hier angegebenen experimentellen Bedingungen (vgl. III.6.2.), da beide Enzymkenngrößen, K_m und V_{max} , durch Isotopeneffekte beeinflußt werden können (JENCKS, 1969; SIMON und KRAUS, 1976; WALSH, 1979).

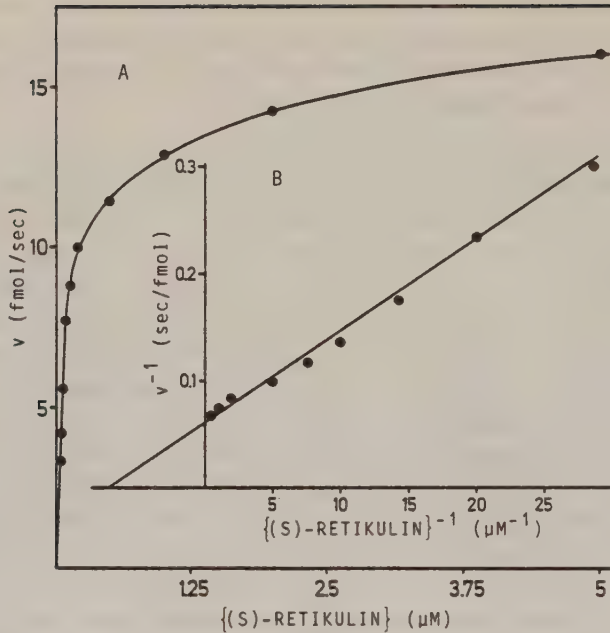


Abb. 35: Substratabhängigkeit der Berberinbrückenenzym-Reaktion, gemessen im Tritium-Ausbauteest. (A) zeigt die Auftragung nach MICHAELIS und MENTEN (1913), (B) nach LINEWEAVER und BURK (1934). Die Versuchsbedingungen sind im Text angegeben.

6.9. Hemmstoffe

Die Art und Weise, mit der ein Enzym durch Hemmstoffe in seiner katalytischen Aktivität beeinflusst wird, gibt häufig Auskunft über seine wesentlichen Eigenschaften. So kann die Untersuchung verschiedener Hemmstoffe die Substratspezifität eines Enzyms verdeutlichen, das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen anzeigen oder die Art

der funktionellen Gruppen bestimmen, die für die Katalyse essentiell sind. Im folgenden wird der Effekt einiger reversibel und irreversibel wirkender Hemmstoffe auf die Aktivität des Berberinbrückenenzym beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Untersuchungen mit dem Tritium-Ausbauteil im Standardverfahren (vgl. III.1.4.) durchgeführt.

Reduzierende Verbindungen zeigten generell eine inaktivierende Wirkung. 3 mM Dithioerythritol oder 6 mM reduziertes Glutathion im Inkubationsansatz bewirkten eine Halbierung der katalytischen Aktivität des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym (vgl. III.5.6.). Einmaliges Einfrieren und Wiederauftauen des Enzym in Standardpuffer, dem β -MSH (20 mM) zugesetzt war, führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (vgl. III.6.10.). Wurde das Enzym bei 30°C in Standardpuffer vorinkubiert, der 5 mM Dithioerythritol enthielt, so nahm die anschließend noch nachweisbare Restaktivität exponentiell mit der Zeit ab ($\tau_{1/2} = 0,6$ Stunden). Dieses Verhalten ist charakteristisch für eine allmähliche, irreversible Modifizierung eines Proteins durch einen Hemmstoff (LEHNINGER, 1975); die Befunde deuten auf eine essentielle Disulfidbrücke in dem aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym hin.

Wasserstoffperoxid kann sowohl reduzierend als auch oxidierend wirken; es gilt jedoch als weitaus stärkeres Oxidationsmittel (WEBB, 1966). Sein Einfluß auf die Aktivität des Berberinbrückenenzym war insofern interessant, als es ein Produkt der Enzymreaktion darstellt (vgl. III.6.2.). Das Enzym zeigte eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber diesem Reagenz; bis zu einer H_2O_2 -Konzentration von 20 mM im Inkubationsansatz war keine Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität des elektrophoretisch gereinigten Enzym festzustellen; eine Halbierung der Enzymaktivität erforderte eine H_2O_2 -Konzentration von 0,7 M.

Cystin gehört zu den spezifischsten Oxidationsmitteln für Sulfhydrylgruppen (WEBB, 1966). In einer Konzentration von 0,8 mM dem Testansatz zugesetzt, zeigte diese Verbindung keinen Effekt auf die katalytische Aktivität des etwa 10-fach angereicherten Berberinbrückenenzym. Andere SH-Reagenzien (p-Hydroxymercuribenzoessäure, N-Äthylmaleinimid, Jodosobenzoessäure und Jodacetamid) erwiesen sich in einer Konzentration von 0,6 mM ebenfalls als wirkungslos. Offenbar besitzt das Berberinbrückenenzym keine essentiellen Sulfhydrylgruppen.

Chelatbildner verringerten die Aktivität des Berberinbrückenenzym in unterschiedlichem Ausmaß. Am wirkungsvollsten war o-Phenanthrolin, das schon in einer Konzentration von 6 μ M im Inkubationsansatz die Aktivität des elektrophoretisch gereinigten Enzym halbierte. Möglicherweise beruht ein Teil der Inhibierung jedoch auf hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Proteinmolekül. Darauf deuten die erheblich höheren Konzentrationen hin, die andere Chelatbildner benötigen, um denselben Hemmeffekt zu erzielen: Diäthylthiocarbamat 0,4 mM, Na_2EDTA 6 mM. Gegenüber weiteren Metallkomplexierenden Agenzien wie NaN_3 und NaCN zeigte das Berberinbrückenenzym eine noch ausgeprägtere Resistenz: erst in Konzentrationen über 50 mM bewirkten diese Verbindungen eine 50 %-ige Hemmung des etwa 15-fach angereicherten Enzym.

Zur Untersuchung der Wirkung von Metallionen auf die Aktivität des Berberinbrückenenzym wurde das elektrophoretisch gereinigte Enzym zunächst gegen 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,6, dialysiert. Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 250 μ l 255 pmol (S)-(NC³H₃)-Retikulin (180 Ci/mol), 25 μ mol Tris/HCl-Puffer, pH 8,6, 1,0 μ mol des jeweiligen Salzes (als Chlorid) und ca. 30 fkat des dialysierten Berberinbrückenenzym. Inkubation und Analyse der Ansätze erfolgten im Standardverfahren (vgl. III.1.4.). Die Resultate der Untersuchung sind in Tabelle 10 dargestellt. Ein

Metallion	Hemmung (%)	Metallion	Hemmung (%)
Li	0	Mn II	47
Na	0	Fe II	64
K	0	Fe III	67
Rb	0	Co II	80
Cs	0	Ni II	59
Mg	5	Cu II	51
Ca	11	Zn	82
Ba	7	Sn II	80

Tab. 10: Einfluß verschiedener Metallionen (als Chloride) auf die Aktivität des Berberinbrückenenzym. Die Agenzien waren den Inkubationsansätzen in einer Konzentration von 4 mM zugesetzt.

stimulierender Effekt konnte nicht verzeichnet werden. Während die Elemente der ersten Hauptgruppe keine und die der zweiten eine nur geringe Hemmwirkung ausübten, zeigten die übrigen Metallionen einen generell stärker inhibierenden Einfluß. Ein praktisch deckungsgleiches Bild ergab sich, wenn das verwendete Enzympräparat zuvor gegen Puffer dialysiert worden war, der 0,1 mM EDTA enthielt.

2,4-Pentandion ist ein Reagenz, mit dem die Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin selektiv und reversibel modifiziert werden können (GILBERT III. und O'LEARY, 1975). Um die Aktivität des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym zu halbieren, mußte es in einer Konzentration von 20 mM den Standard-Inkubationsansätzen zugesetzt werden. Eine essentielle Funktion einer der genannten Aminosäuren bei der Katalyse des Berberinbrückenenzym erscheint aufgrund dieses Befundes unwahrscheinlich.

Das Flavanoid Morin (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavon)

wurde als potenter Inhibitor Flavin-haltiger Oxidoreduktasen beschrieben (BÜHLER und SIMON, 1982; AMANN et al., 1984). Es zeigte bis zu einer Konzentration von 1 mM im Inkubationsansatz keinerlei hemmenden Einfluß auf die Aktivität des etwa 15-fach angereicherten Berberinbrückenenzym. Die Resistenz des Enzyms spricht gegen eine Beteiligung eines Flavins an der Katalyse.

Der Einfluß einiger Alkaloide vom Benzylisochinolin- und Protoberberintyp auf die Aktivität des elektrophoretisch gereinigten Berberinbrückenenzym wurde untersucht; die Resultate zeigt Abb. 36. (S)-Norretikulin bewirkte schon in einer Konzentration von 1 μ M eine 50 %-ige Hemmwirkung. Zur Erzielung desselben Effektes mußte von seinem (R)-Enantiomer die 20-fache Konzentration eingesetzt werden. Der Befund deutet darauf hin, daß das Berberinbrückenenzym seine Stereoselektivität schon durch die unterschiedliche Bindung der enantiomeren Substrate (und nicht erst bei der Katalyse) ausübt. (S)-Scoulerin, das Enzymprodukt, erwies sich als weit effektiverer Inhibitor als sein Pseudoisomeres (S)-Coreximmin. Jatrorrhizin, der dominante Alkaloid-Inhaltsstoff aus Berberis-Zellkulturen (HINZ und ZENK, 1981), zeigte eine geringere Hemmwirkung als seine biosynthetische Vorstufe (BEECHER und KELLEHER, 1983; RUEFFER et al., 1983a) Berberin, die ebenfalls aus Berberis-Zellkulturen isoliert werden konnte (HINZ und ZENK, 1981).

6.10. Stabilität des Berberinbrückenenzym

Von entscheidender Bedeutung für die enzymatische Arbeit ist die Kenntnis der Bedingungen, die den Erhalt der katalytischen Aktivität des Untersuchungsobjektes optimal gewährleisten. Unter diesem Gesichtspunkt wurde der Einfluß verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Stabilität des Berberinbrückenenzym studiert.

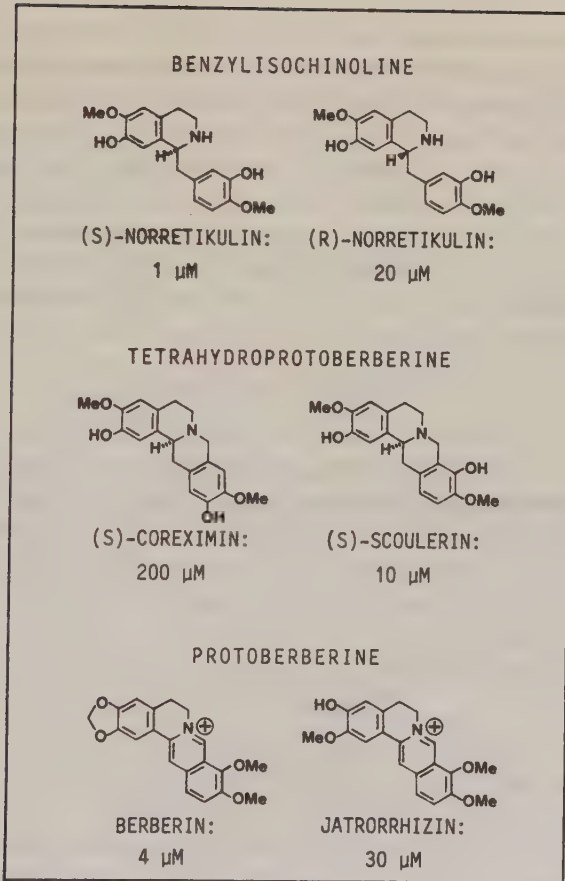


Abb. 36: Hemmung des Berberinbrückenenzym durch einige Alkaloide vom Benzylisochinolin- und Protoberberintyp. Die angegebenen Konzentrationen bewirkten eine Halbierung der katalytischen Aktivität (gemessen im Standard-Tritium-Ausbaute; vgl. III. 1.4.).

50 μ l-Aliquots eines etwa 15-fach angereicherten, sterilfiltrierten Enzympräparates (Eluat der hydrophoben Chromatographie; vgl. III.5.5.; 46 fkat Aktivität, entsprechend 0,22 μ g Protein) wurden in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, bei -20, 4, 25 und 37°C aufbewahrt. Eine Testserie bestand aus Ansätzen, die zusätzlich 50 μ l 87 %-iges Glycerin enthielten; sie wurden bei -20°C gelagert. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurde die verbliebene Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen im Tritium-Ausbaustest bestimmt (vgl. III.1.4.). Die Resultate der Untersuchung gibt Abb. 37 wieder.

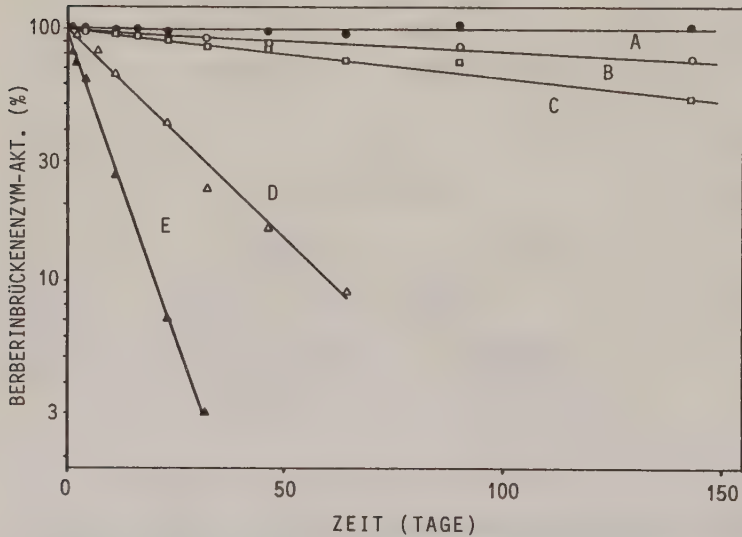


Abb. 37: Stabilität des Berberinbrückenenzym unter verschiedenen Bedingungen. A: -20°C, in Gegenwart von Glycerin; B: -20, C: 4, D: 25 und E: 37°C. Weitere Angaben im Text.

In Gegenwart von Glycerin erwies sich das Berberinbrückenenzym bei -20°C als stabil. Ohne Glycerin verlor es allmählich an Aktivität, wobei die Inaktivierungsrate mit der Temperatur zunahm. Die Halbwertszeiten seiner katalytischen Aktivität betrugen:

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	-20	4	25	37
τ (Tage)	320	150	18	6

6.11. Intrazelluläre Verteilung des Berberinbrückenenzyms

Die Fraktionierung von Zellhomogenaten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation hat zu wichtigen Erkenntnissen über die Zusammenhänge zwischen subzellulären Strukturen und ihren physiologischen Funktionen geführt. Die Methode wurde verwendet, um die intrazelluläre Verteilung des Berberinbrückenenzyms zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die Leitenzyme verschiedener Organelle bestimmt, um eine mögliche Korrelation zwischen ihnen und dem Berberinbrückenenzym aufdecken zu können.

Die Gewinnung des Extrakts aus frisch geerntetem Gewebematerial der B. beaniana-Zellkultur und seine Fraktionierung durch isopyknische Ultrazentrifugation auf einem linearen Saccharose-Dichtegradienten erfolgten in Anlehnung an die Methode von BEEVERS et al. (1974); sie sind unter II.2.2.3. beschrieben. Die mit diesem Verfahren erzielte Auftrennung der untersuchten Enzymaktivitäten gibt Abb. 38 wieder.

Etwa 90 % der Gesamtaktivität des Berberinbrückenenzym waren durch ein annähernd symmetrisches Aktivitätsmaximum bei einer Dichte von $1,14 \text{ g/ml}$ repräsentiert. Die restliche Aktivität war im Überstand des Gradienten lokalisiert. Das Haupt-Aktivitätsmaximum korrespondierte mit keinem der

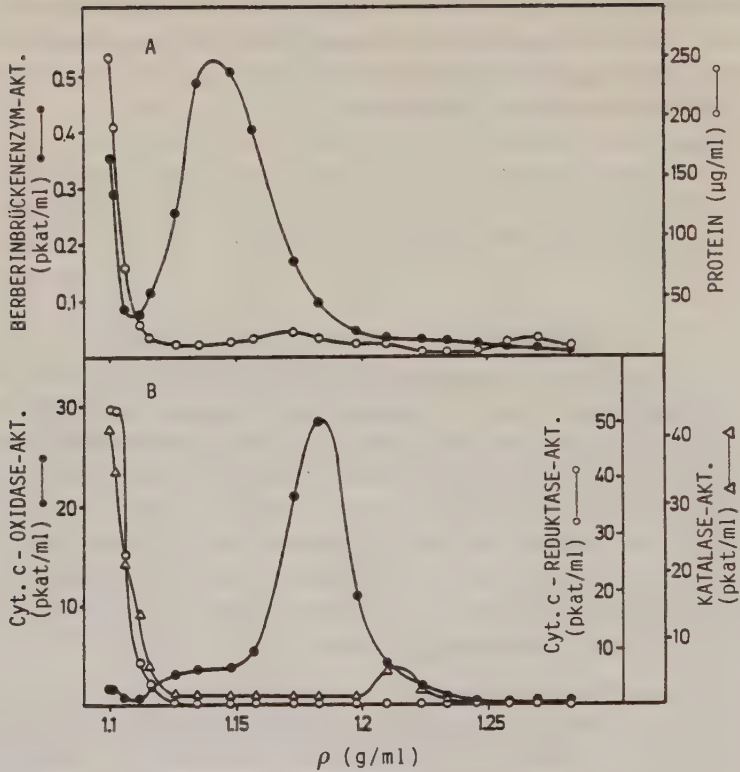


Abb. 38: Verteilung des Proteins, der Berberinbrückenenzym-Aktivität (A), sowie der Cytochrom c-Oxidase-, -Reduktase- und der Katalase-Aktivität (B) eines *B. beaniana*-Zellkulturextraktes auf einem linearen Saccharose-Dichtegradienten (18-60 % w/w; 48 ml). Die Aktivitätsbestimmung des Berberinbrückenenzym erfolgte im Tritium-Ausbaute (III.1.4.), die der Leitenzyme ist unter II.2.3.3. beschrieben.

übrigen Leitenzyme. Es war eindeutig verschieden von dem des Mitochondrien-Leitenzyms Cytochrom c-Oxidase ($\rho = 1,185$ g/ml). Katalase, das Leitenzym für Glyoxysomen, zeigte eine zweigipfelige Aktivitätsverteilung: die Hauptaktivität wurde im Überstand des Gradienten gefunden; eine signifikante Nebenaktivität war bei einer Dichte von $1,215$ g/ml nachweisbar. Fraktionen mit der für Glyoxisomen charakteristischen Dichte ($1,25$ g/ml; COOPER, 1981) waren frei von Katalase-Aktivität. Cytochrom c-Reduktase, ein Leitenzym für microsomale Vesikel, war ausschließlich im Überstand des Gradienten nachweisbar. Für Fragmente des glatten endoplasmatischen Retikulums, die aufgrund des EDTA-Zusatzes im Aufschluß- und Zentrifugationsmedium zu erwarten wären, ist eine Gleichgewichtsdichte von $1,12$ g/ml beschrieben (LORD, 1983).

Die Resultate zeigen, daß das Berberinbrückenenzym nicht zu den löslichen Proteinen des Cytosols zählt, sondern zum allergrößten Teil (wenn nicht ausschließlich) Partikel-gebunden in der Zelle vorliegt. Positive Aussagen über die Identität dieses Organells lassen die bisherigen Experimente nicht zu. Möglicherweise ist das Enzym nur locker membrangebunden oder vesikulär eingeschlossen. Darauf deutet der Befund hin, daß Extrakte, die unter Standardbedingungen (vgl. III.5.2.) aus tiefgefrorenem Gewebematerial gewonnen wurden, eine andere Verteilung der Berberinbrückenenzym-Aktivität im Saccharose-Gradienten zeigten: sie war ausschließlich im Überstand des Gradienten nachweisbar.

IV. DISKUSSION

Bei der Erforschung spezifischer Biosyntheseleistungen auf dem Feld des Sekundärstoffwechsels haben sich in den letzten Jahren pflanzliche Zellsuspensionskulturen mehrfach als hervorragend geeignete Forschungsobjekte erwiesen. Beispielsweise wurden Zellkulturen der Petersilie (Petroselinum hortense) zur Untersuchung der Enzymatik und Regulation der Flavanoid-Biosynthese erfolgreich eingesetzt (HAHL-BROCK, 1977). Die Biosynthesesequenz für die Bildung der Heteroyohimbinalkaloide konnte mit Hilfe einer selektierten Catharanthus roseus-Zelllinie auf zellfreiem Niveau vollständig aufgeklärt werden (STÖCKIGT, 1980; ZENK, 1980). Gegenüber differenzierten Pflanzen besitzen pflanzliche Zellkulturen wesentliche Vorteile (ZENK, 1982): sie können, unabhängig von jahreszeitlichen und Witterungs-bedingten Einflüssen, unter genau definierten Bedingungen herangezogen werden. Dies ermöglicht die Gewinnung homogenen Zellmaterials von konstanter Qualität. Die höhere Stoffwechselaktivität der isoliert wachsenden Zellen erlaubt eine vergleichsweise schnelle Produktion von Untersuchungsmaterial und eine problemlose Anpassung an wechselnden Bedarf. Ihre Fragilität erleichtert zudem den Zellaufschluß und die Freisetzung der gesuchten Inhaltsstoffe.

Bezeichnenderweise gelang auch der Nachweis des Berberinbrückenenzymis erstmals durch die Verwendung von Zellkulturen (RINK und BÖHM, 1975). Suspensionskulturen der Papaveracee Macleaya microcarpa erschienen deshalb als aussichtsreiches Untersuchungsobjekt, weil sie mehrere von Protoberberinen abgeleitete Alkaloide produzieren (KOBBLITZ et al., 1975). Die weiteren (eingangs genannten) enzymatischen Untersuchungen zur Biosynthese der Protoberberinalkaloide wurden ebenfalls an verschiedenen Zellkulturen

durchgeführt (KELLEHER et al., 1980; RUEFFER et al., 1981; RUEFFER et al., 1983b; AMANN et al., 1984). Die Norretikulin-spezifische N-Methyltransferase, das letzte Enzym innerhalb der Benzylisochinolin-Biosynthese, konnte in Zellkulturen aus 4 verschiedenen Pflanzenfamilien nachgewiesen werden (WAT et al., 1984); den weitaus höchsten Gehalt zeigte eine Kultur von Berberis wilsoniae var. subcaulialata. Zur Isolierung des Enzyms aus dieser Kultur wurde im Rahmen dieser Arbeit ein vereinfachtes Reinigungsverfahren entwickelt, mit dem es von interferierenden O-Methyltransferase-Aktivitäten befreit wurde. Das so angereicherte Enzympräparat konnte zur Darstellung spezifisch markierter, optisch reiner Retikulinpräparate verwendet werden, die in der Höhe ihrer spezifischen Radioaktivität und im Grad ihrer optischen Reinheit entsprechenden, chemisch dargestellten Verbindungen (BATTERSBY et al., 1965c; BATTERSBY et al., 1975a) deutlich überlegen waren. Mit Hilfe der N-Methyl-tritiierten Retikulinpräparate war es möglich, die enzymatische Berberinbrückenbildung sehr empfindlich zu messen; die Nachweisgrenze lag bei 0,05 fkat. Verglichen mit dem zuvor benutzten chromatographischen Analysensystem (RINK und BÖHM, 1975) war das Testverfahren erheblich einfacher in der Durchführung und gestattete einen hohen Probendurchsatz. So konnte in einer Vielzahl von Rohextrakten aus differenzierten Pflanzen und aus Zellkulturen die Aktivität des Berberinbrückenenzym quantitativ bestimmt werden. In allen untersuchten Zellkulturen, in denen das Berberinbrückenenzym nachgewiesen werden konnte, wurde ausschließlich und ausnahmslos das (S)-Enantiomer des Retikulins metabolisiert. Hiermit wurde erstmals die absolute Stereoselektivität des Berberinbrückenenzym auf zellfreiem Niveau demonstriert. Dieser Befund bestätigt die Resultate einer Reihe von Fütterungsexperimenten, die gezeigt hatten, daß (S)-Retikulin die spezifische Vorstufe verschiedener

Protoberberinalkaloide ist (vgl. I.).

Die Ausschließlichkeit, mit der das (S)-Enantiomer dieses Alkaloids durch Extrakte von 57 Zellkulturen aus 5 verschiedenen Pflanzenfamilien metabolisiert wurde, könnte zu der verallgemeinernden Feststellung verführen, daß diese Stereokonfiguration eine generelle Voraussetzung für die biosynthetische Ausbildung der Berberinbrücke darstellt. Diese Vermutung hatte ursprünglich SPENSER (1968) aufgrund verschiedener Fütterungsexperimente geäußert. Da die Berberinbrücke unter Beibehaltung der Stereokonfiguration am Chiralitätszentrum der Benzyloisochinolinalkaloide gebildet wird (BATTERSBY et al., 1975a; FURUYA et al., 1978, BHAKUNI et al., 1983a; diese Arbeit), folgt aus dieser Annahme, daß Tetrahydroprotoberberine primär mit (S)-Konfiguration am C-Atom 14 (vgl. Abb. 1) biosynthetisiert werden. Für die Entstehung der natürlich vorkommenden razemischen (z.B. Aurotensin, ein partielles Razemat aus (S)- und (R,S)-Scoulerin in Glaucium flavum (MANSKE und ASHFORD, 1954)) oder optisch reinen (R)-Tetrahydroprotoberberine (z.B. (R)-Tetrahydropalmatin in Corydalis cava (SPÄTH et al., 1923)) muß dann eine Konfigurationsumkehr nach der Berberinbrückenbildung gefordert werden. Als Mechanismus dieser Umwandlung wäre eine Oxidation des (S)-Tetrahydroprotoberberins zum C14-N7-Dehydroberbiniumion vorstellbar, das anschließend zum (R)-Tetrahydroprotoberberin rückreduziert wird (Abb. 39). Dieser Mechanismus entspricht demjenigen, den BATTERSBY et al. (1965c) für die gegenseitige Umwandlung der beiden Retikulin-Enantiomere ineinander in Papaver somniferum gezeigt hatten. Das C14-N7-Dehydroberbiniumion wurde von AMANN et al. (1984) als Zwischenstufe der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Reaktion vorgeschlagen.

Diese Hypothese zur Biosynthese der (R)-Tetrahydroprotoberberinalkaloide steht jedoch im Widerspruch zu dem Bericht, daß (2',6',8-³H₃)-markiertes (R)-Retikulin die stereo-

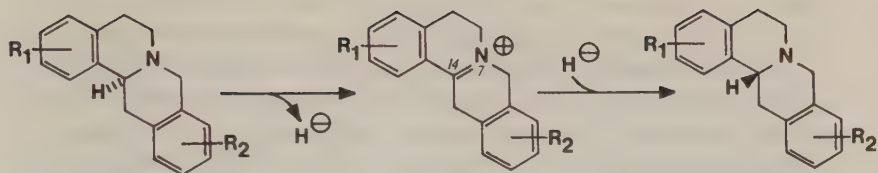


Abb. 39: Hypothetischer Mechanismus zur biosynthetischen Bildung der Tetrahydroprotoberberinalkaloide mit (R)-Konfiguration

spezifische Vorstufe des Tetrahydroprotoberberins (R)-Sinactin in Cocculus laurifolius bildet: es wurde mit einer Einbaurrate von 0,027 % ca. 15-fach effektiver inkorporiert als entsprechend markiertes (S)-Retikulin (BHAKUNI et al., 1983b). Dieser Befund könnte für die Existenz eines für (R)-Benzylisochinolinalkaloide spezifischen Berberinbrückenenzym in dieser Menispermacee sprechen. Es wäre interessant, zellfreie Enzymextrakte aus dieser Pflanze mit dem in dieser Arbeit entwickelten Testverfahren zu untersuchen.

Dieses Testsystem, in dem der Tritiumausbau aus (NC^3H_3) -Retikulin als Maß für die Aktivität des Berberinbrückenenzym diente, wurde zur Entwicklung eines Verfahrens benutzt, mit dem dieses Enzym aus Berberis beaniana-Zellkulturen isoliert und bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Hierbei offenbarte sich die Interferenz eines weiteren Enzym des Protoberberinstoffwechsels, das als (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase identifiziert werden konnte (AMANN et al., 1984). Die Anwesenheit dieses Enzyms führte zu einer Anhebung des maximalen Tritium-Ausbaus von 33 auf 66 % der eingesetzten Radioaktivitätsmenge und beschleunigte

nigte die Rate der Tritium-Freisetzung. Für die Charakterisierung des Berberinbrückenenzym war die vollständige Abtrennung dieser interferierenden Aktivität eine notwendige Voraussetzung. Dieses Ziel wurde nach 4 Reinigungsschritten erreicht. Bemerkenswert ist, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase anhand ihrer Fähigkeit nachgewiesen wurde, (S)-(C1-³H)-Retikulin unter Freisetzung des Tritium-Atoms zu 1,2-Dehydroretikulin umzusetzen (AMANN, 1982). Die vollständige Trennung dieser Aktivität von der des Berberinbrückenenzym, das in seiner hochgereinigten Form keinen Tritium-Ausbau aus (C1-³H)-Retikulin bewirkt, zeigt, daß bei der Berberinbrückenbildung das Chiralitätszentrum des Retikulins nicht angegriffen wird. Diese Schlußfolgerung hatten bereits BATTERSBY et al. (1975a) aus einem in vivo-Experiment gezogen. Sie fütterten (R,S)-(C1-³H, ¹⁴C3)-Retikulin an Chelidonium majus und isolierten das radioaktiv markierte Tetrahydroprotoberberinalkaloid Stylopin, dessen Isotopenverhältnis mit dem des Substrats übereinstimmte. Ein Tritium-Ausbau am C-Atom 1 des Retikulins hatte also nicht stattgefunden.

Für die Anreicherung des Berberinbrückenenzym bis zur Homogenität erwies sich ein vielstufiges Reinigungsverfahren als unumgänglich. Der Zeitbedarf für eine Aufarbeitung betrug etwa eine Woche; durch die gute Reproduzierbarkeit ließ sich der Analysenaufwand erheblich reduzieren - ein Vorteil, der die Nützlichkeit der homogenen Qualität des aus Zellkulturen gewonnenen Ausgangsmaterials unterstreicht. Die geringe Ausbeute an Enzymaktivität (0,7 %), die mit dem beschriebenen Verfahren erreicht wurde, ist erstaunlich angesichts der Stabilität, die das ca. 15-fach angereicherte Berberinbrückenenzym bewies; die Halbwertszeit seiner katalytischen Aktivität betrug bei 4°C 150 Tage. Bemerkenswerterweise wurden die mit Abstand höchsten Aktivitätsverluste im Gelfiltrationsschritt

verzeichnet. Mit dieser ausgesprochen schonenden Fraktionierungsmethode konnte jedoch die Hauptmenge der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase abgetrennt werden (vgl. Tab. 7). Wie die (verlustarme) Rechromatographie (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-freier Berberinbrückenenzym-Präparate zeigte, waren die Aktivitäts-Einbußen vermutlich weitgehend auf die Abtrennung der (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase zurückzuführen. Möglicherweise übt dieses Enzym, das übrigens im selben Organell wie das Berberinbrückenenzym lokalisiert zu sein scheint (vgl. AMANN et al., 1984), eine stimulierende Wirkung auf das Berberinbrückenenzym aus. Die systematische Untersuchung eines derartigen Effektes steht jedoch noch aus; methodisch böte sich die chromatographische Analyse der Metabolisierung ¹⁴C-markierter Substrate an, mit der zwischen den beiden Aktivitäten eindeutig differenziert werden kann (vgl. Abb. 14).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung des Berberinbrückenenzyms wurden größtenteils mit hoch angereichertem, elektrophoretisch gereinigtem, jedoch nicht mit dem homogenen Enzympräparat durchgeführt. Die Isolierung des Enzyms in reiner, aktiver Form eröffnet neue Möglichkeiten für eine weitergehende Bestimmung seiner Eigenschaften. So könnten seine Aminosäure-Zusammensetzung und -Sequenz untersucht und Experimente zur positiven Identifizierung der Natur seines katalytischen Zentrums in Angriff genommen werden. Erschwerend wird sich hierbei die geringe Menge an Untersuchungsmaterial auswirken; aus 250 g Zellmaterial (FG) der B. beaniana-Kultur konnten nur 11 µg des reinen Berberinbrückenenzyms gewonnen werden. Durch die Anwendung immunologischer Techniken sind höhere Ausbeuten durchaus vorstellbar (bei gleichzeitiger Vereinfachung der Isolierungsprozedur); für ihre Entwicklung ist die Verfügbarkeit eines von Verunreinigungen freien Antigens (des homogenen Berberinbrückenenzyms) eine

vorteilhafte Ausgangsposition.

Das einzige Alkaloid, das das aus B. beaniana-Zellkultur isolierte Berberinbrückenenzym aus (S)-Retikulin bildet, konnte zweifelsfrei als (S)-Scoulerin identifiziert werden. Die biosynthetische Bedeutung dieses Alkaloids dokumentieren mehrere in vivo-Experimente. Es wurde u. a. als Vorstufe des Benzophenanthridinalkaloids Chelidonin in Chelidonium majus (BATTERSBY et al., 1975b) sowie des Phthalidisochinolinalkaloids Narcotin in Papaver somniferum (BATTERSBY et al., 1968) erkannt. Coreximin, das Pseudoisomer des Scoulerins (vgl. Abb. 23), das in Papaver somniferum wie Scoulerin aus Retikulin biosynthetisch entsteht (BROCHMANN-HANSEN et al., 1971), wurde durch das hier beschriebene Enzym in vitro nicht gebildet. Zellfreie Rohextrakte aus P. somniferum-Zellkulturen und aus Wurzeln der differenzierten Pflanze zeigten signifikante bzw. ausgeprägte Berberinbrückenenzym-Aktivität im Tritium-Ausbau-Testverfahren. Zu welchem Anteil dieser Effekt auf der Bildung des einen und/oder des anderen Protoberberins beruht, wurde bislang nicht untersucht. Sollten beide Alkaloide entstehen, so wäre es interessant, festzustellen, ob ihre Bildung durch ein unspezifisches oder zwei unterschiedliche, spezifische Enzyme katalysiert wird.

Die Untersuchung der Gesamtreaktionsbilanz des Berberinbrückenenzym zeigte, daß bei der oxidativen Zyklisierung des (S)-Retikulins zu (S)-Scoulerin äquimolare Mengen an Sauerstoff verbraucht und an H_2O_2 gebildet werden. O_2 ist also der Akzeptor der beiden bei der Reaktion freigesetzten Reduktionsäquivalente. Dieser Befund gestattet die systematische Bezeichnung des Berberinbrückenenzym als (S)-Retikulin : O_2 -Oxidoreduktase (E.C. 1.7.3.-.) (vgl. PFAENDER, 1982).

Die Identifizierung von Sauerstoff und Wasserstoffperoxid als stöchiometrische Teilnehmer an der Berberinbrückenenzym-Reaktion lieferte zwei zusätzliche Parameter, mit denen die Enzymaktivität bequem analysiert werden kann. Die Messung dieser Größen führt jedoch nur dann zu aussagekräftigen Resultaten, wenn das untersuchte Enzympräparat frei von Katalase- und von (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase-Aktivität ist. Beide Enzyme wurden in Extrakten aus B. beaniana-Zellkultur nachgewiesen. Das letztgenannte Enzym, das auch im Tritium-Ausbaute test interferiert, verfälscht sowohl die O_2 - als auch die H_2O_2 -Bestimmung, indem es bei der Umsetzung des Berberinbrückenenzym-Produkts (S)-Scoulerin zusätzlich Sauerstoff verbraucht und H_2O_2 freisetzt (AMANN et al., 1984). Ein weiterer Nachteil dieser alternativen Methoden zur Bestimmung der Berberinbrückenenzym-Aktivität ist ihre relativ geringe Empfindlichkeit. Ihre Nachweisgrenze liegt mit ca. 10 fkat um den Faktor 200 über derjenigen des Standard-Tritium-Ausbaute tests. Der dadurch bedingte Mehrverbrauch an Enzym steht einer routinemäßigen Anwendung dieser Methoden entgegen.

Der Vergleich der Umsatzraten von (S)-Retikulin und (S)-(NC³H₃)-Retikulin, die mit den verschiedenen Analysemethoden ermittelt wurden, offenbarte einen deutlichen Isotopeneffekt der enzymkatalysierten Berberinbrückenbildung. Dieser Isotopeneffekt ist ein schwerwiegender Nachteil, der dem Tritium-Ausbau-Testsystem notwendigerweise anhaftet. Er fällt besonders dann ins Gewicht, wenn es um die Bestimmung von Größen geht, die eine absolute und nicht nur eine relative Angabe der Enzymaktivität implizieren. So hat sich der Tritium-Ausbaute test durchaus als tauglich erwiesen, beispielsweise die Verteilung der Berberinbrückenenzym-Aktivität in Säuleneluat en zu bestimmen. Für die Isolierung des Enzyms und seine Reinigung bis zur Homogenität ist er unverzichtbar gewesen. Einige der mit diesem

Analysenverfahren ermittelten Kenngrößen des Enzyms sind jedoch sicher durch den Isotopeneffekt beeinflusst. Zu diesen Kenngrößen zählt die Wechselzahl des Enzyms, die Aktivierungsenergie der Reaktion und der K_M -Wert für das Substrat (S)-Retikulin. Eine Überprüfung der hier berichteten Ergebnisse wäre mit Hilfe der genannten alternativen Methoden zur Bestimmung der Berberinbrückenenzym-Aktivität möglich.

Die Frage nach der Identität der prosthetischen Gruppe (Gruppen?) des Berberinbrückenenzyms läßt sich aufgrund der in der vorliegenden Arbeit berichteten Resultate nicht eindeutig beantworten. Immerhin ermöglichen die Befunde einige Spekulationen. In biologischen Systemen existieren vier Klassen von prosthetischen Gruppen, die für Reaktionen mit Sauerstoff verantwortlich sind: Kupfer, Non-Haem-Eisen, Haeme und Flavine (KEEVIL und MASON, 1978). Da das Berberinbrückenenzym sich als resistent erwies gegenüber CN^- , dem klassischen Hemmstoff der mit Sauerstoff interagierenden Haem-Gruppen, kann diese funktionelle Gruppe ausgeschlossen werden.

Aus demselben Grund erscheint auch Kupfer als katalytisches Zentrum wenig wahrscheinlich: die Mehrzahl der bislang untersuchten, Cu-haltigen Oxidoreduktasen wird durch Cyanid gehemmt (MAHLER und CORDES, 1971). Zu diesen Enzymen zählt beispielsweise die aus Schweineleber isolierte Harnsäure-Oxidase (MAHLER, 1963). Sie überträgt (in Analogie zum Berberinbrückenenzym) ein Elektronenpaar ihres Substrats auf molekularen Sauerstoff, wodurch stöchiometrische Mengen an H_2O_2 gebildet werden. Es wurden jedoch auch Cu-haltige Oxidasen beschrieben, die relativ unempfindlich gegenüber CN^- sind; dies gilt etwa für eine Hexose-Oxidase der Rotalge Chondrus crispus (SULLIVAN Jr. und IKAWA, 1973) oder eine aus Schweineleber gewonnene Monoamin-Oxidase (CARPER et al., 1974). Die Cyanid-Resistenz des Berberinbrücken-

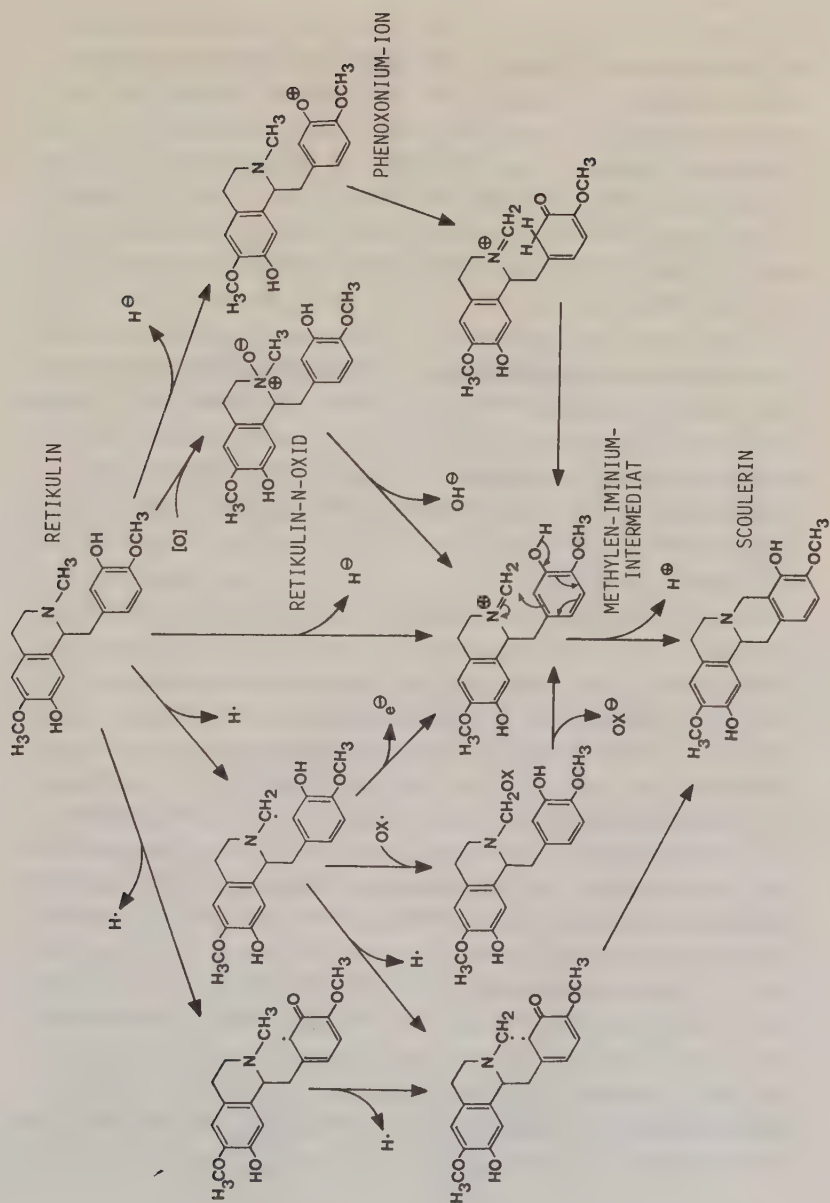
zyms reicht daher nicht aus, seine Identität als Cu-Proteid auszuschließen. Auch der Einfluß des besonders Kupfer effizient komplexierenden Chelatbildners Diäthylthiocarbamat (MAHLER und CORDES, 1971) läßt keine eindeutigen Schlußfolgerungen zu: zwar zeigte dieser Inhibitor eine deutliche, aber bei weitem nicht die ausgeprägteste Hemmwirkung auf das Enzym (50 % Hemmung bei einer Konzentration von 400 μM ; o-Phenanthrolin: 6 μM).

"Einfache" Non-Haem-Eisen-Proteine werden solche Proteine genannt, die ausschließlich Fe-S-Cluster als prosthetische Gruppe(n) enthalten. Da sie hauptsächlich als bloße Elektronenüberträger fungieren und typischerweise Molekulargewichte ≤ 25 kD aufweisen (ORME-JOHNSON und ORME-JOHNSON, 1978), erscheint es unwahrscheinlich, daß es sich beim Berberinbrückenenzym um einen Vertreter dieses Proteintyps handeln könnte. Allerdings wurden Fe-S-Zentren als zusätzliche funktionelle Gruppen in einigen Flavoproteinen nachgewiesen, die höhere Molekulargewichte besitzen und Oxidations-/Reduktions-Reaktionen katalysieren. Ein derartiges Ferroflavoprotein ist die Dihydroorotat-Dehydrogenase aus Zymobacterium oroticum, das je zwei Moleküle FMN und FAD sowie vier Grammatome Fe und Säure-labilen Schwefel besitzt und (u. a.) die Reaktion katalysiert: Dihydroorotat + $\text{O}_2 \longrightarrow$ Orotat + H_2O_2 (ALEMAN und HANDLER, 1967). Eine ähnliche Cofaktor-Zusammensetzung könnte die o-Phenanthrolin-Sensitivität des Berberinbrückenenzym erklären. Flavin-enthaltende Enzyme stellen die weitaus größte Gruppe der bislang untersuchten Oxidasen, die Sauerstoff zu H_2O_2 reduzieren (KEEVIL und MASON, 1978). Insofern wäre es nicht erstaunlich, wenn auch das Berberinbrückenenzym sich als Flavoprotein erwiese. Dieser Möglichkeit widerspricht jedoch der Befund, daß es durch das Flavanoid Morin kaum in seiner katalytischen Aktivität beeinträchtigt wird.

Eine eindeutige Identifizierung der prosthetischen Gruppe(n) des Berberinbrückenenzym(s) kann nur mit Hilfe spektroskopischer Methoden (wie z. B. Fluoreszenz- oder Atomabsorptions-Spektroskopie) erfolgen. Derartige Untersuchungen erfordern jedoch größere Mengen an homogenem Enzym, als bisher zur Verfügung standen.

Zu der Frage, nach welchem Mechanismus die enzymkatalysierte Berberinbrücken-Bildung erfolgt, sind bereits wiederholt Mutmaßungen angestellt worden (BARTON et al., 1965a; SCHÜTTE, 1969; KAMETANI et al., 1976); sie sind in Abb. 40 zusammenfassend dargestellt. Grundsätzlich kann die Umwandlung über ionische oder radikalische Zwischenstufen erfolgen. Im erstgenannten Reaktionsweg ist ein Methylen-Iminium-Intermediat die unmittelbare Vorstufe des Endprodukts Scoulerin, im zweiten ist es eine diradikalische Zwischenstufe. Ausgehend von diesen Zwischenstufen wäre eine Ringschluß-Reaktion ohne Enzymbeteiligung vorstellbar (KAMETANI et al., 1976). Für den ionischen Reaktionsmechanismus wäre dann eine freie Hydroxylfunktion mit abstrahierbarem Proton in o- oder p-Stellung zur Ringschluß-Position erforderlich (vgl. Abb. 40). Derselbe Substituent könnte jedoch ebenfalls für den radikalischen Reaktionsweg essentiell sein: er gestattet die Ausbildung des postulierten intermediären, resonanzstabilisierten Phenolatradikals. Tatsächlich erwiesen sich in den bisherigen in vitro-Untersuchungen der Berberinbrücken-Bildung ausschließlich solche Benzylisochinolin-Alkaloide als metabolisierbare Substrate, die in 3'-Position eine Hydroxylfunktion tragen (BÖHM und RINK, 1975; diese Arbeit). Wie aus den obigen Darlegungen

Abb. 40: Mögliche Mechanismen der enzymatischen Berberinbrücken-Bildung. Links sind radikalische, in der Mitte und rechts ionische Reaktionswege dargestellt. Verändert nach BARTON et al. (1965a), SCHÜTTE (1969) und KAMETANI et al. (1976).



hervorgeht, hat dieser Befund jedoch keine Aussagekraft hinsichtlich der Frage, ob die Reaktion über einen ionischen oder einen radikalischen Mechanismus abläuft. Eine positive Identifizierung der postulierten Methylen-Iminium-Zwischenstufe wäre möglich durch die NMR-spektroskopische Untersuchung der enzymatischen Metabolisierung ^{13}C - oder ^{15}N -markierter Substrate; radikalische Intermediate könnten durch Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie detektiert werden.

Die Beteiligung eines N-Oxids des Retikulins als mögliche Zwischenstufe eines ionischen Reaktionsmechanismus (BARTON et al., 1965a; SCHÜTTE, 1969; KAMETANI et al., 1976) erscheint aufgrund der Resultate der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich. Keines der beiden diastereomeren (R)- bzw. (S)-Retikulin-N-Oxide wurde von dem aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym als Substrat akzeptiert.

Die bisherigen Überlegungen zum Reaktionsmechanismus betreffen nur die oxidative Hälfte der Berberinbrückenenzym-Reaktion, die Umsetzung von Retikulin zu Scoulerin, ohne Berücksichtigung der komplementären Teilreaktion, nämlich der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid. Als Diradikal ist O_2 unfähig, mit Elektronenpaaren zu reagieren und neigt vielmehr zu radikalischen Reaktionsmechanismen (FRIDOVICH, 1974). Derartige Reaktionen können leicht unter physiologischen Bedingungen ablaufen, wenn das intermediäre freie Radikal Teil eines Resonanz-stabilisierten Systems (wie z. B. des Flavin-Semichinons) ist (KEEVIL und MASON, 1978). Allerdings kann Sauerstoff auch ionische Reaktionen mit organischen Molekülen eingehen. Dazu muß er durch ein Übergangsmetall zu einem System mit delokalisierten Elektronen komplexiert sein, so daß die Anzahl der ungepaarten Elektronen während der Reaktion konstant bleiben kann (KEEVIL und MASON, 1978). Offen-

sichtlich kann die Frage des Reaktionsmechanismus nicht losgelöst von derjenigen nach der Natur des aktiven Zentrums des Enzyms betrachtet werden. Um eine eventuelle Relation zwischen den Mechanismen der beiden Teilreaktionen des Berberinbrückenenzym feststellen zu können, wäre es zunächst erforderlich, zu untersuchen, ob das Enzym mit den beiden Substraten Retikulin und Sauerstoff einen ternären Komplex bildet oder sich sukzessiv mit jeweils einem Substrat zu binären Komplexen vereinigt. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten erlaubt die kinetische Analyse der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von den Konzentrationen beider Substrate (LEHNINGER, 1975).

Der Befund, daß das Berberinbrückenenzym der B. beaniana-Suspensionskultur nicht im Cytosol der Zellen, sondern in einem Organell der Dichte $\rho = 1,14$ g/ml lokalisiert ist, spiegelt vermutlich eine physiologische Notwendigkeit wider. Wie die in dieser Arbeit berichteten in vitro-Hemmstoffuntersuchungen gezeigt haben, gehören Protoberberinium-Salze zu den potentesten Inhibitoren des Berberinbrückenenzym. Diese Verbindungen werden von der B. beaniana-Zellkultur in beträchtlichem Maße (5,7 % des Trockengewichts) akkumuliert (HINZ und ZENK, 1981). Offenbar ist das Berberinbrückenenzym nur aufgrund einer stringenten Kompartimentierung in der Lage, ihre Biosynthese in diesem Umfang zu bewerkstelligen. Diese Interpretation wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß das Enzym in Rohextrakten aus B. beaniana-Zellkultur, bei deren Gewinnung die zellulären Strukturen zerstört wurden, drastisch gehemmt wird (Abb. 16).

Außer der Trennung des Berberinbrückenenzym von seinen Reaktionsprodukten könnte die Kompartimentierung einem weiteren Zweck dienen: der Bereitstellung eines Reaktionsraumes mit einem vergleichsweise alkalischen pH-Wert. Dies wäre

eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Katalyse, da das Enzym bei neutralem pH-Wert nur etwa 10 % der Aktivität aufweist, die es an seinem pH-Optimum (8,9) entfaltet (Abb. 28). Das dem Berberinbrückenenzym in der Biosynthese sequenz unmittelbar vorgeschaltete Enzym, eine aus Berberis vulgaris-Zellkulturen isolierte Norretikulin-N-Methyltransferase, zeigt ein scharf ausgeprägtes pH-Optimum bei pH 7,8 (WAT et al., 1984). Über die intrazelluläre Verteilung dieses Enzyms liegen bisher keine experimentellen Daten vor. Ob bei der Biosynthese der Protoberberinalkaloide möglicherweise spezifische Transportvorgänge beteiligt sind, ließe sich nachweisen durch die Verabreichung radioaktiver Alkaloidvorstufen (z. B. Tyrosin) an Berberis-Kulturen, gefolgt von der kinetischen Untersuchung der intrazellulären Verteilung der markierten Stoffwechselprodukte durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Von vorrangiger Bedeutung für ein besseres Verständnis der physiologischen Rolle des Berberinbrückenenzym ist die positive Identifizierung des Organells, in welchem es lokalisiert ist.

Vergleicht man die Eigenschaften des in dieser Arbeit untersuchten Enzyms mit denen des aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym (RINK und BÖHM, 1975; BÖHM und RINK, 1975), so sind einige Gemeinsamkeiten, jedoch auch Unterschiede zu konstatieren. Beide Enzyme setzen Retikulin in einer Sauerstoff-abhängigen Reaktion zu Scoulerin um. Cofaktoren wie Pyridinnukleotide werden nicht benötigt. Unterschiedlich sind die pH-Optima der beiden Enzyme: während das Berberinbrückenenzym aus B. beaniana-Zellkultur ein relativ steilflankiges Aktivitäts-Optimum bei pH 8,9 aufweist, zeigt das aus Macleaya microcarpa-Zellkulturen gewonnene Enzym seine maximale Aktivität in einem pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,2. Das Benzylisochinolinalkaloid Laudanidin (vgl. Abb. 32) wird von dem

letztgenannten Enzym metabolisiert, jedoch von dem in dieser Arbeit beschriebenen Enzym nicht als Substrat akzeptiert. Diese Unterschiede machen deutlich, daß es offenbar keinen Prototypen des Berberinbrückenenzym gibt, dessen Eigenschaften verallgemeinerbar wären. Die vergleichende Charakterisierung von Berberinbrückenenzymen aus Pflanzenmaterial unterschiedlicher taxonomischer Herkunft bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Zum Nachweis und zur Untersuchung des Berberinbrücken-
knenzyms wurden spezifisch radioaktiv markierte Sub-
strate in optisch reiner Form dargestellt: (R)- und (S)-
Norretikulin wurde mit S-Adenosyl-L- $(^{14}\text{CH}_3)$ - bzw. $-(\text{C}^3\text{H}_3)$ -
methionin zu entsprechend N-methylmarkiertem (R)- bzw.
(S)-Retikulin umgesetzt. Die Umsetzung erfolgte enzyma-
tisch mit Hilfe einer neuen, Norretikulin-spezifischen
N-Methyltransferase, die aus Berberis wilsoniae var.
subcaulialata-Zellkulturen gewonnen wurde. Das Enzym
konnte in einem 3-stufigen Verfahren (Ammoniumsulfat-
fällung, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatogra-
phie) von störenden Fremdaktivitäten gereinigt und 6-
fach angereichert werden. Mit authentischem Retikulin
versetzt, zeigte das Enzymprodukt nach mehreren dünn-
schichtchromatographischen Reinigungsschritten und einer
Derivatisierung konstante spezifische Radioaktivität.
Die Ausbeuten an gereinigtem Produkt, bezogen auf die
eingesetzte Radioaktivitätsmenge, betrugen 43 % für (R)-
 ^{14}C -, 53 % für (S)- ^{14}C -, 23 % für (R)- ^3H - und 44 % für
(S)- ^3H -Retikulin. Die spezifischen Aktivitäten der Prä-
parate wurden zu 44 bzw. 46 Ci/mol für die ^{14}C -markier-
ten (R)- und (S)-Enantiomere des Retikulins und zu 3,2
bzw. 7,2 Ci/mmol für die entsprechenden tritiierten Prä-
parate bestimmt.
2. Mit Hilfe des (NC^3H_3) -Retikulins konnte ein Enzym-
test für das Berberinbrückenenzym entwickelt werden,
der darauf beruht, daß bei der Umsetzung von Retikulin
zu Scoulerin ein Tritiumatom der N-Methylgruppe abge-
spalten wird. Dieses freigesetzte Tritium konnte, nach
Adsorption der markierten Alkaloide an Aktivkohle, im
Medium der Testansätze bestimmt und als Maß für die En-

zymaktivität herangezogen werden. Der vollständige Umsatz von Retikulin zu Scoulerin war erwartungsgemäß mit einem Ausbau von 33 % der Tritiummarkierung verbunden. Die Nachweisgrenze des standardmäßig benutzten Testsystems lag bei einer Enzymaktivitätsmenge von 0,05 fkat.

3. Die Metabolisierung der ^{14}C -markierten, optisch reinen Retikulinpräparate durch zellfreie Extrakte aus 67 Suspensionskulturen 9 verschiedener Pflanzenfamilien wurde autoradiographisch untersucht. Während das (S)-Enantiomer mehrheitlich weitgehend und zu mehreren, distinkten Produkten umgesetzt wurde, gelang für das (R)-Enantiomer keine zweifelsfreie Demonstration einer Metabolisierung. Lediglich in Anwesenheit von SAM konnte bei einigen Arten die Bildung von Reaktionsprodukten eindeutig nachgewiesen werden.
4. Der Tritium-Ausbautest wurde zum Nachweis der Berberinbrückenenzym-Aktivität in zellfreien Extrakten benutzt, die aus differenzierten Pflanzen und Zellkulturen gewonnen worden waren. 8 von 18 getesteten Pflanzen und 58 von 65 untersuchten Zellkulturen, für die das Auftreten von Protoberberinen charakteristisch ist, enthielten die gesuchte Aktivität. Die Korrelation der gemessenen Enzymaktivität mit der Fähigkeit zur Protoberberinalkaloid-Biosynthese läßt vermuten, daß zwischen ihnen eine funktionelle Beziehung besteht.

Das Berberinbrückenenzym setzte, unabhängig davon, aus welcher Zellkultur es isoliert wurde, ausschließlich das (S)-Enantiomer des Retikulins um. Hiermit konnte erstmals auf zellfreier Ebene die absolute Stereoselektivität der biosynthetischen Berberinbrückenbildung demonstriert werden.

5. Die Zellkultur der Berberidacee Berberis beaniana Schneid. wies mit 320 pkat/l Medium einen besonders hohen Gehalt an Berberinbrückenenzym auf und wurde als Quelle für die Gewinnung des Enzyms ausgewählt. Sie ist durch ein steilflankiges Maximum der Enzymaktivität nach 11-tägiger Kultivierungsdauer gekennzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Kultur am Übergang zwischen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase.

In einem 5-stufigen Verfahren (Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, hydrophobe Chromatographie, präparative Disc-Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung) konnte das Berberinbrückenenzym mit einer Ausbeute von 0,7 % 440-fach angereichert werden. Die Homogenität des gereinigten Enzyms wurde SDS-gelelektrophoretisch nachgewiesen. Seine spezifische Aktivität betrug 6420 pkat/mg Protein, entsprechend einer Umsatzzahl von 0,35 mol Substratumsatz/mol Enzym x Sekunde.

6. Das Produkt der Umsetzung von (S)-Retikulin durch das Berberinbrückenenzym konnte eindeutig als (S)-Scoulerin identifiziert werden (Dünnschichtchromatographie, HPLC, UV- und Massenspektroskopie, Derivatisierung, NMR und Polarimetrie). Bei seiner Bildung werden stöchiometrische Mengen an O_2 verbraucht und an H_2O_2 gebildet. Eine Untersuchung der Kinetik aller Reaktionsparameter (Retikulin- und O_2 -Verbrauch, Scoulerin- und H_2O_2 -Bildung, Tritium-Ausbau an (NC^3H_3) -Retikulin) zeigte, daß die Tritium-Freisetzung mit nur 61 % der Rate der übrigen Parameter erfolgte. Dieser Befund demonstriert einen eindeutigen Isotopeneffekt der enzymkatalysierten Reaktion.

7. Folgende Eigenschaften des aus B. beaniana-Zellkulturen isolierten Berberinbrückenenzym wurden ermittelt:

Sein pH-Optimum liegt bei pH 8,9.

Das Temperaturoptimum liegt im Bereich zwischen 40 und 50°C; aus dem Arrhenius-Diagramm errechnet sich eine Aktivierungsenergie von 48,6 kJ/mol, entsprechend einem Temperaturkoeffizienten (Q_{10} -Wert) von 1,9 im Intervall zwischen 20 und 30°C.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt bei pH 4,9.

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration zu 48,5 kD und durch SDS-Gelelektrophorese zu 54,5 kD bestimmt.

Von 13 getesteten N-Methyl-Benzylisochinolinalkaloiden wurden neben (S)-Retikulin ausschließlich (S)-Protosinomenin und (R,S)-Laudanosolin durch das Enzym metabolisiert. Keines der vier Stereoisomeren des Retikulin-N-Oxids, ein potentiell Intermediat bei der biosynthetischen Berberinbrückenbildung, erwies sich als metabolisch aktiv.

Der K_m -Wert des Enzyms für (S)-Retikulin beträgt 0,14 μ M.

Das Berberinbrückenenzym ist empfindlich gegenüber reduzierenden Verbindungen (50 % Hemmung bei 3 mM Dithioerythritol und 6 mM reduziertem Glutathion) und gegenüber bestimmten Chelatbildnern (50 % Hemmung bei 6 μ M o-Phenanthrolin, 0,4 mM Diäthylthiocarbamat und 6 mM Na_2EDTA). Es erwies sich als resistent gegenüber Hemmstoffen wie NaN_3 , NaCN , verschiedenen Oxidationsmitteln und Sulfhydrylreagentien, 2,4-Pentandion und dem Flavonoid Morin. Von 16 getesteten Chloridsalzen zeigten in einer Konzentration von 4 mM lediglich Mn II, Fe II,

Fe III, Co II, Ni II, Cu II, Zn und Sn II eine deutliche Hemmwirkung. Verschiedene Benzylisochinolin- und (Tetrahydro)protoberberinalkaloide erwiesen sich als potente Hemmstoffe. Eine 50 %ige Hemmung des Enzyms kann mit 1 μ M (S)-Norretikulin, 20 μ M (R)-Norretikulin, 10 μ M (S)-Scoulerin, 200 μ M (S)-Coreximin, 4 μ M Berberin und 30 μ M Jatrorrhizin erzielt werden.

In Gegenwart von 50 % (v/v) Glycerin bei -20°C aufbewahrt, zeigte das Enzym über einen Zeitraum von 5 Monaten keinerlei Aktivitätsverluste. In Abwesenheit von Glycerin zeigte es bei -20°C eine Halbwertszeit seiner katalytischen Aktivität von 320 Tagen, bei 4°C von 150 Tagen, bei 25°C von 18 Tagen und bei 37°C von 6 Tagen.

Unter Aufschlußbedingungen, die die Integrität subzellulärer Partikel gewährleisten, ließ sich die Enzymaktivität im Saccharose-Dichtegradienten praktisch ausschließlich in einer nicht identifizierten Fraktion der Dichte 1,14 g/ml lokalisieren.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ALEMAN, V., HANDLER, P.: Dihydroorotate Dehydrogenase. I. General Properties. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4087-4096.
- AMANN, M.: Untersuchungen zur Konfigurationsumkehr in der Morphinbiosynthese. Reinigung und Charakterisierung einer (S)-Norretikulin-Dehydrogenase aus pflanzlichen Zellkulturen. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1982).
- AMANN, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Tetrahydroprotoberberine Oxidase the Final Enzyme in Protoberberine Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 953-954.
- ANDREWS, P.: Estimation of the Molecular Weight of Proteins by Sephadex Gelfiltration. *Biochem. J.* 91 (1964) 222-233.
- ANDREWS, P.: The Gelfiltration - Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weight over a Wide Range. *Biochem. J.* 96 (1965) 595-606.
- AUTERHOFF, H.: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1978).
- BARTON, D.H.R.: The Biogenesis of Phenolic Alkaloids. Hugo Mueller Lecture. *Proc. Chem. Soc. (London)* (1963) 293-298.
- BARTON, D.H.R., HESSE, R.H., KIRBY, G.W.: The Origine of the "Berberine Carbon". *Proc. Chem. Soc. (London)* (1963) 267-268.
- BARTON, D.H.R., HESSE, R.H., KIRBY, G.W.: Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part VIII. Investigations on the Biosynthesis of Berberine and Protopine. *J. Chem. Soc.* (1965a) 6379-6389.
- BARTON, D.H.R., KIRBY, G.W., STEGLICH, W., THOMAS, G.M., BATTERSBY, A.R., DOBSON, T.A., RAMUZ, H.: Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. *J. Chem. Soc.* (1965b) 2423-2438.
- BATHER, P.A., LINDSAY-SMITH, J.R., NORMAN, R.O.C.: Amine oxidation. Part V. Reactions of some N-Oxides, including Heterocyclic-Ring Formation, with Sulphur Dioxide, Acetic Anhydride, and Trifluoroacetic Anhydride. *J. Chem. Soc. (C)* (1971) 3060-3068.

- BATTERSBY, A.R., HARPER, B.J.T.: Biogenesis of Papaverine. Proc. Chem. Soc. (London) (1959) 152.
- BATTERSBY, A.R.: The Biosynthesis of Alkaloids. Tilden Lecture. Proc. Chem. Soc. (London) (1963) 189-200.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., HIRST, M., STAUNTON, J.: Biosynthesis of the "Berberine Bridge". Proc. Chem. Soc. (London) (1963) 268.
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., FRANCIS, R.J., McCALDIN, D.J., RAMUZ, H.: Alkaloid Biosynthesis. Part IV. 1-Benzyl-isoquinolines as Precursors of Thebaine, Codeine and Morphine. J. Chem. Soc. (1964) 3600-3610.
- BATTERSBY, A.R., EVANS, G.W. MARTIN, R.O., WARREN, M.E., RAPOPORT, H.: Configuration of Reticuline in the Opium Poppy. Tetrahedron Lett. (1965a) 1275-1278.
- BATTERSBY, A.R., FOULKES, D.M., BINKS, R.: Alkaloid Biosynthesis. Part VIII. Use of Optically Active Precursors for Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. (1965c) 3323-3332.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., RUVEDA, E.A., STAUNTON, J.: Biosynthesis of Chelidonine and Stylopine. J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1965b) 89-91.
- BATTERSBY, A.R., HIRST, M.: Concerning the Biosynthesis of Narcotine. Tetrahedron Lett. (1965) 669-673.
- BATTERSBY, A.R., SOUTHGATE, R., STAUNTON, J., HIRST, M.: Synthesis of (+)- and (-)-Scoulerine and of (+)- and (-)-Coreximine. J. Chem. Soc. (C) (1966) 1052-1057.
- BATTERSBY, A.R., HIRST, M., McCALDIN, D.J., SOUTHGATE, R., STAUNTON, J.: Alkaloid Biosynthesis. Part XII. The Biosynthesis of Narcotine. J. Chem. Soc. (C) (1968) 2163-2172.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., HIRST, M., RUVEDA, E.A., STAUNTON, J.: Biosynthesis. Part XXI. Investigations on the Biosynthesis of Stylopine in Chelidonium majus. J. Chem. Soc. Perkin I (1975a) 1140-1147.
- BATTERSBY, A.R., STAUNTON, J., WILTSHIRE, H.R., FRANCIS, R. J., SOUTHGATE, R.: Biosynthesis. Part XXII. The Origin of Chelidonine and of Other Alkaloids Derived from the Tetrahydroprotoberberine Skeleton. J. Chem. Soc. Perkin I (1975b) 1147-1156.

- BEECHER, C.W.W., KELLEHER, W.J.: The Incorporation of Berberine into Jatrorrhizine. *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 469-472.
- BEEVERS, H., THEIMER, R.R., FEIERABEND, J.: Microbodies (Glyoxisomen, Peroxisomen). In: *Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle*. Jacobi, G. (ed.). Thieme Verlag Stuttgart (1974) 127-146.
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 70 (1976) 241-250.
- BERGMAYER, H.U., GAWEHN, K., GRASSL, M.: Katalase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Band 1. Bergmayer, H.U. (ed.). Verlag Chemie Weinheim (1970) 439-440.
- BERNT, E., BERGMAYER, H.U.: Anorganische Peroxyde. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Band 2. Bergmayer, H.U. (ed.). Verlag Chemie Weinheim (1970) 2165-2167.
- BHAKUNI, D.S., GUPTA, S., JAIN, S.: The Biosynthesis of the Alkaloids of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers. *Tetrahedron* 39 (1983a) 4003-4010.
- BHAKUNI, D.S., JAIN, S., GUPTA, S.: Absolute Configuration and Biosynthesis of (+)-Sinactine. *Tetrahedron* 39 (1983b) 455-459.
- BLAICH, R.: *Analytische Elektrophoreseverfahren*. Thieme Verlag Stuttgart (1978).
- BÖHM, H., RINK, E.: Zur Rolle eines Reticulin-umwandelnden Enzyms (Berberin-Brücken-Enzym) im pflanzlichen Benzylisochinolin-Stoffwechsel. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 168 (1975) 69-77.
- BOIT, H.G.: *Ergebnisse der Alkaloidchemie bis 1960*. Akademie-Verlag Berlin (1961).
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- BRIGGS, G.E., HALDANE, J.B.S.: L. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* 19 (1925) 338-339.
- BROCHMANN-HANSEN, E., FURUJA, T.: A New Opium Alkaloid. Isolation and Characterization of ($\pm$)-1-(3'-hydroxy-4'-methoxybenzyl)-2-Methyl-6-methoxy-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (($\pm$)-reticuline). *Planta medica* 12 (1964) 328-333.

- BROCHMANN-HANSEN, E., NIELSEN, B.: (+)-Reticuline - a New Opium alkaloid. *Tetrahedron Lett.* (1965) 1271-1274.
- BROCHMANN-HANSEN, E., FU, C.-C., ZANATI, G.: Opium Alkaloids. IX. Detection of Coreximine in *Papaver somniferum*. Based on its Biosynthesis from Reticuline. *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 873-878.
- BÜHLER, M., SIMON, H.: On the Kinetics and Mechanism of Enolate Reductase. *Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 609-625.
- CANTONI, G.L.: S-Adenosylmethionine-Revisited. In: Transmethylation and Methionine Biosynthesis. Shapiro, S.K., Schlenk, F. (eds.). Univ. Chicago Press (1965) 21-32.
- CARPER, W.R., STODDARD, D.D., MARTIN, D.F.: Pig Liver Monoamine Oxidase I: Isolation and Characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 334 (1974) 287-296.
- CASHAW, J.L., McMURTRY, K.D., BROWN, H., DAVIS, V.E.: Identification of Catecholamine-Derived Alkaloids in Mammals by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatog.* 99 (1974) 567-573.
- CHEN, C.-Y., MACLEAN, D.B.: Mass Spectra and Proton Magnetic Resonance Spectra of Some Tetrahydroprotoberberine Alkaloids. *Can. J. Chem.* 46 (1968) 2501-2506.
- CHERVU, L.R., MURTY, D.R.K.: Radiolabeling of Antigens: Procedures and Assessment of Properties. In: Radioimmunoassay. Freeman, L.M., Blaurock, M.D. (eds.). Grune & Stratton Verlag New York San Francisco London (1975) 33-48.
- CLARKE, J.T.: Simplified Disk (Polyacrylamid Gel) Electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 428-436.
- COOPER, T.G.: *Biochemische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1981).
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons New York Chichester Brisbane Toronto (1981).
- CORRODI, H., HARDEGGER, E.: Die Konfiguration des natürlichen Laudanosins sowie verwandter Tetrahydroisochinolin-, Aporphin- und Tetrahydroberberin-Alkaloide. *Helv. chim. Acta* 39 (1956) 889-890.

- DASGUPTA, S., RAY, A.B., BHATTACHARYA, S.K., BOSE, R.:
Constituents of Pachygone ovata and Pharmacological
Action of its Major Leaf Alkaloid. J. Nat. Prod. 42
(1979) 399-406.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Pharmakologie und
Toxikologie. Wissenschaftsverlag (1977).
- FRIDOVICH, I.: Superoxide Dismutase. In: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. Hayaishi, O. (ed.). Academic Press New York London (1974) 453-478.
- FROHNE, D., JENSEN, U.: Systematik des Pflanzenreichs.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1979).
- FUKUI, H., NAKAGAWA, K., TSUDA, S., TABATA, M.: Production of Isoquinoline Alkaloids by Cell Suspension Cultures of Coptis japonica. In: Plant Tissue Culture 1982. Fujiwara, A. (ed.). Maruzen Co. Tokio (1982) 313-314.
- FURUJA, T., NAKANO, M., YOSHIKAWA, T.: Biotransformation of (R,S)-Reticuline and Morphinane Alkaloids by Cell Cultures of Papaver somniferum. Phytochemistry 17
(1978) 891-893.
- GALLATI, H. VON: Aktivitätsbestimmung von Peroxidase mit Hilfe des "Trinder-Reagens". J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977) 699-703.
- GAMBORG, O.L., MÜLLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res. 50 (1968) 151-158.
- GEAR, J.R., SPENSER, I.D.: The Biosynthesis of Hydrastine and Berberine. Can. J. Chem. 41 (1963) 783-803.
- GERHARDT, B., BEEVERS, H.: Influence of Sucrose on Protein Determination by Lowry-Procedure. Anal. Biochem. 24
(1968) 337-339.
- GESSNER, O.: Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa. Karl Winter Universitätsverlag Heidelberg (1953).
- GILBERT III, H.F., O'LEARY, M.H.: Modification of Arginine and Lysine in Proteins with 2,4-Pentanedione. Biochemistry 14 (1975) 5194-5199.
- GOPINATH, K.W., GOVINDACHARI, T.R., PAI, B.R., VISWANATHAN, N.: Konstitution von Retikulin, einem neuen Alkaloid aus Anona reticulata Linn.. Chem. Ber. 92 (1959) 776-779.

- GUPTA, R.N., SPENSER, I.D.: Biosynthetic Incorporation of One-Carbon Units into Berberine and Hydrastine. *Can. J. Chem.* 43 (1965) 133-144.
- HAHLBROCK, K.: Regulatory Aspects of Phenylpropanoid Biosynthesis in Cell Cultures. In: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1977) 95-111.
- HAHN, G., STIEHL, K.: Über β -(Oxy-phenyl)-äthylamine und ihre Umwandlungen. IV. Mitteilung: Synthese von Tetrahydro-isochinolincarbonsäuren und die spontane Decarboxylierung von α -Ketosäuren unter physiologischen Bedingungen. *Chem. Ber.* 69 (1936) 2627-2654.
- HAHN, G., STIEHL, K.: Über β -(Oxy-phenyl)-äthylamine und ihre Umwandlungen. V. Mitteilung: Kondensation von Oxy-phenyl-äthylaminen mit α -Ketosäuren. *Chem. Ber.* 71 (1938) 2141-2153.
- HAWORTH, R.D., PERKIN JR., W.H., RANKIN, J.: CCXIX.- ψ -Berberine. *J. Chem. Soc.* 125 (1924) 1686-1701.
- HEGNAUER, R.: Bedeutung der Chemotaxonomie für die pharmazeutische Biologie. In: *Biogene Arzneistoffe*. Czygan, F.-C. (ed.). Vieweg-Verlag Braunschweig Wiesbaden (1984) 157-175.
- HINZ, H., ZENK, M.H.: Production of Protoberberine Alkaloids by Cell Suspension Cultures of *Berberis* Species. *Naturwissenschaften* 68 (1981) 620-621.
- HOBERMAN, H.D., D'ADAMO JR., A.F.: Coupling of Oxidation of Substrates to Reductive Synthesis. V. Studies with 2-Deutero-L-Lactate and 2-Tritio-L-Lactate. *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 523-524.
- JANDER, G., BLASIUS, E.: Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. Hirzel-Verlag Stuttgart (1973).
- JEFFS, P.W.: The Protoberberine Alkaloids. In: *The Alkaloids*. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 9 (1967) 41-115.
- JEFFS, P.W., SCHARVER, J.D.: Biosynthesis of Ophiocarpine. Introduction of a Stereospecific Label through Transannular Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 4301-4310.
- JENCKS, W.P.: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. McGraw-Hill Book Co. New York (1969).

- KAMETANI, T., IHARA, M., TAKAHASHI, K.: Biotransformation of (+)-Reticuline in Rat. Chem. Pharm. Bull. 20 (1972) 1587-1588.
- KAMETANI, T., FUKUMOTO, K.: Benzyloisoquinoline and Homobenzyloisoquinoline Alkaloids. In: Alkaloids. Wiesner, K. (ed.). Butterworth London and University Park Press Baltimore 9 (1973) 181-234.
- KAMETANI, T., TAKEMURA, M., IHARA, M., TAKAHASHI, K., FUKUMOTO, K.: Biotransformation of 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-methylisoquinolines into Tetrahydroprotoberberines with Rat Liver Enzymes. J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 1956-1959.
- KAMETANI, T., OHTA, Y., TAKEMURA, M., IHARA, M., FUKUMOTO, K.: Biotransformation of Reticuline into Coreximine, Scoulerine, Pallidine, and Isoboldine with Rat Liver Enzyme. Bioorg. Chem. 6 (1977) 249-256.
- KAMETANI, T., IHARA, M.: Biomimetic Synthesis of Protoberberine Alkaloids and Aporphine Alkaloids through N-Oxide Intermediates. Heterocycles 12 (1979) 893-896.
- KAMETANI, T., KANAYA, N., OHTA, Y., IHARA, M.: Biotransformation of Isoquinoline Alkaloids with Rat Liver Microsomes. Heterocycles 14 (1980) 963-970.
- KATSUI, N., SATO, K., TOBINAGA, S., TAKEUCHI, N.: Alkaloids of Lysichiton camtschaticense Schott var. Japonicum Makino. Tetrahedron Lett. (1966) 6257-6261.
- KEEVIL, T., MASON, H.S.: Molecular Oxygen in Biological Oxidations - an Overview. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.). Academic Press New York London LII (1978) 3-40.
- KELLEHER, W.J., ROTHER, A., WELLMANN, E., GRISEBACH, H.: Enzymatic Formation of Protoberberine Alkaloids. Planta medica 40 (1980) 127-136.
- KLEINSCHMIDT, G., MOTHES, K.: Zur Physiologie und Biosynthese der Alkaloide von Papaver somniferum. Z. Naturforsch. 14b (1959) 52-56.
- KOBLITZ, H., SCHUMANN, U., BÖHM, H., FRANKE, J.: Gewebekulturen aus Alkaloidpflanzen. IV. Macleaya microcarpa (Maxim) Fedde. Experientia 31 (1975) 768-769.
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685.

- LAEMMLI, U.K., FAVRE, M.: Maturation of the Head of Bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80 (1973) 575-599.
- LEHNINGER, A.L.: *Biochemistry*. Worth Publishers New York (1975).
- LEWIS, E.S.: Isotope Effects in Hydrogen Transfer Reactions. In: *Isotopes in Organic Chemistry*. Buncl, E., Lee, C.C. (eds.). Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam II (1976) 127-152.
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658-666.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 110-125.
- LORD, J.M.: Endoplasmic Reticulum and Ribosomes. In: *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells*. Hall, J.L., Moore, A.L. (eds.). Academic Press New York London (1983) 119-134.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., RANDALL, R.J.: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- MAHLER, H.R.: Uricase. In: *The Enzymes*. Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K. (eds.). Academic Press New York London VIII (1963) 285-296.
- MAHLER, H.R., CORDES, E.H.: *Biological Chemistry*. Harper & Row New York (1971).
- MANSKE, R.H.F., ASHFORD, W.R.: The Protoberberine alkaloids. In: *The Alkaloids*. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London IV (1954) 77-118.
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1968).
- MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1971).
- MELCHIOR, C., COLLINS, M.A.: The Route and Significance of Endogenous Synthesis of Alkaloids in Animals. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 9 (1982) 313-356.
- MERCK, G.: Vorläufige Notiz über eine neue organische Base im Opium. *Annalen Chem.* 66 (1848) 125-128.

- MEYERSON, L.R., DAVIS, V.E.: Purification and Characterization of a Benzyltetrahydroisoquinoline Methyltransferase from Rat Liver. *Federation Proc.* 34 (1975) 508.
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49 (1913) 333-369.
- MICHAL, G.: Bestimmung von Michaelis-Konstanten und Inhibitor-Konstanten. In: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. (eds.). Verlag Chemie Weinheim (1977) 30-41.
- MONKOVIC, I., SPENSER, I.D.: Biosynthesis of Berberine and Berberastine. *Can. J. Chem.* 43 (1965) 2017-2026.
- MORRISSEY, J.H.: Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: a Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. *Anal. Biochem.* 117 (1981) 307-310.
- MOTHES, K.: Biologie der Alkaloide. In: Biosynthese der Alkaloide. Mothes, K., Schütte, H.R. (eds.). VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin (1969) 1-18.
- NOZAKI, Y., SCHECHTER, N.M., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C.: Use of Gel Chromatography for the Determination of the Stokes Radii of Proteins in the Presence and Absence of Detergents. A Reexamination. *Biochemistry* 15 (1976) 3884-3890.
- OHIRI, F.C., VERPOORTE, R., BAERHEIM SVENDSEN, A.: ^1H NMR Chemical Shift Values for Aromatic Protons in 2,3,9,10- and 2,3,10,11-Tetrasubstituted Tetrahydroprotoberberine Alkaloids. *Planta medica* 49 (1983) 162-164.
- ORME-JOHNSON, W.H., ORME-JOHNSON, N.R.: Overview of Iron-Sulfur Proteins. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.). Academic Press New York London LIII (1978) 259-268.
- PAKRASHI, S.C., MUKHOPADHYAY, R., GHOSH DASTIDAR, P.P., BHATTACHARJYA, A., ALI, E.: Bharatamine - a Unique Protoberberine Alkaloid from *Alangium lamarckii* THW., Biogenetically Derived from Monoterpenoid Precursor. *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 291-294.
- PFAENDER, P.: Enzyme. Bezugsquellen, Daten, Eigenschaften. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1982).
- PFITZNER, U., ZENK, M.H.: Immobilization of Strictosidine Synthase from *Catharanthus* Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine. *Planta medica* 46 (1982) 10-14.

- PICTET, A., GAMS, A.: Synthese des Berberins. Chem. Ber. 44 (1911) 2480-2485.
- PICTET, A., SPENGLER, T.: Über die Bildung von Isochinolin-Derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. Chem. Ber. 44 (1911) 2030-2036.
- PORRO, M., VITI, S., ANTONI, G., SALETTI, M.: Ultrasensitive Silver-Stain Method for the Detection of Proteins in Polyacrylamid Gels and Immunoprecipitates on Agarose Gels. Anal. Biochem. 127 (1982) 316-321.
- PREININGER, V.: The Pharmacology and Toxicology of the Papaveraceae Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H. F. (ed.). Academic Press New York London 15 (1975) 207-261.
- RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch. Springer Verlag Berlin Göttingen Heidelberg (1956).
- RICE, K.C., BROSSI, A.: Expedient Synthesis of Racemic and Optically Active N-Norreticuline and N-Substituted and 6'-bromo-N-Norreticulines. J. Org. Chem. 45 (1980) 592-601.
- RINK, E., BÖHM, H.: Conversion of Reticuline into Scoulerine by a Cell Free Preparation from *Macleaya microcarpa* Cell Suspension Cultures. FEBS Lett. 49 (1975) 396-399.
- ROBINSON, R.: LXXV.- A Theory of the Mechanism of the Phytochemical Synthesis of Certain Alkaloids. J. Chem. Soc. (1917) 876-899.
- ROBINSON, R.: The Structural Relations of Natural Products. Oxford University Press (1955).
- ROBINSON, T.: The Biochemistry of Alkaloids. In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics. Kleinzeller, A., Springer, G.F., Wittmann, H.G. (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 3 (1968).
- RUEFFER, M., EL-SHAGI, H., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Norlaudanoline Synthase: the First Enzyme in the Benzyloquinoline Biosynthetic Pathway. FEBS Lett. 129 (1981) 5-9.
- RUEFFER, M., EKUNDAYO, O., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Biosynthesis of the Protoberberine Alkaloid Jatrorrhizine. Tetrahedron Lett. 24 (1983) 2643-2644.

- RUEFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of S-Adenosylmethionine : (R),(S)-Norlaudanosoline-6-O-Methyltransferase from *Argemone platyceras* Cell Cultures. *Planta medica* 49 (1983) 131-137.
- SANDLER, M., CARTER, S.B., HUNTER, K.R., STERN, G.M.: Tetrahydroisoquinoline Alkaloids: in vivo Metabolites of L-Dopa in Man. *Nature* 241 (1973) 439-440.
- SCHÖPF, C.: Die Synthese von Naturstoffen, insbesondere von Alkaloiden, unter physiologischen Bedingungen und ihre Bedeutung für die Frage der Entstehung einiger pflanzlicher Naturstoffe in der Zelle. *Angew. Chem.* 50 (1937) 797-805.
- SCHÖPF, C., SALZER, W.: Zur Frage der Biogenese der 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolinalkaloide. *Annalen Chem.* 544 (1940) 1-30.
- SCHRAUWEN, J.: Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamidsäulchen. *J. Chromatog.* 23 (1966) 177-180.
- SCHÜTTE, H.R.: Isochinolinalkaloide. In: Biosynthese der Alkaloide. Mothes, K., Schütte, H.R. (eds.). VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin (1969) 367-419.
- SCOTT, J.R.: Genetic Studies on Bacteriophage P1. *Virology* 36 (1968) 564-574.
- SEIGLER, D.S.: Plant Systematics and Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 16 (1977) 1-82.
- SHAMMA, M.: The Isoquinoline Alkaloids. Chemistry and Pharmacology. Academic Press New York London. Verlag Chemie Weinheim (1972).
- SIEGMUND, P., KÖRBER, F., DIETSCH, P.: Praktikum der physiologischen Chemie. Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1976).
- SIMON, H.: Die Anwendung von Tritium in der Biochemie. In: Biochemie und Physiologie der Alkaloide (Tagungsbericht). Mothes, K., Schröter, H.-B. (eds.). Akademie-Verlag Berlin (1963) 273-282.
- SIMON, H., KRAUS, A.: Hydrogen Isotope Transfer in Biological Processes. In: Isotopes in Organic Chemistry. Buncl, E., Lee, C.C. (eds.). Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam 2 (1976) 153-229.

- SLUYTERMAN, L.A.Ä., WIJDENES, J.: Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on Ion Exchangers in the Absence of an Externally Applied Potential. In: Proc. Int. Symp. Electrofocusing and Isotachopheresis. Radola, B.J., Graesslin, D. (eds.). Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1977) 463-466.
- SPÄTH, E., MOSETTIG, E., TRÖTHANDL, O.: Zur Kenntnis der Alkaloide von Corydalis cava. Chem. Ber. 56 (1923) 875-879.
- SPÄTH, E., KRUTA, E.: Über die Synthese von berberinartigen Basen aus Verbindungen vom Typus des Tetrahydropapaverins. Monatsh. f. Chem. 50 (1928) 341-348.
- SPÄTH, E., KUFFNER, F., KESZTLER, F.: Über die Synthese von Benzyl-tetrahydro-isochinolin-Basen unter sogenannten physiologischen Bedingungen. Chem. Ber. 69 (1936) 378-384.
- SPÄTH, E., KUFFNER, F., KESZTLER, F.: Über die Synthese von 1-Benzyl-tetrahydro-isochinolin-Basen. Chem. Ber. 70 (1937) 1017-1019.
- SPENSER, I.D.: The Biosynthesis of Alkaloids and of Other Nitrogenous Secondary Metabolites. In: Comprehensive Biochemistry. Florkin, M., Stotz, E.H. (eds.). Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam (1968) 231-413.
- SRIBNEY, M., KIRKWOOD, S.: Origin of the Methylenedioxy Groups of the Alkaloid Protopine. Nature 171 (1953) 931-933.
- STABA, E.J., ZITO, S., AMIN, M.: Alkaloid Production from Papaver Tissue Cultures. J. Nat. Prod. 45 (1982) 256-262.
- STÖCKIGT, J.: The Biosynthesis of Heteroyohimbine-Type Alkaloids. In: Indole and Biogenetically Related Alkaloids. Phillipson, J.D., Zenk, M.H. (eds.). Academic Press New York London (1980) 113-141.
- STRYER, L.: Biochemistry. W.H. Freeman & Co. San Francisco (1981).
- SU, C.-H., GREENE, R.C.: Regulation of Methionine Biosynthesis in Escherichia coli: Mapping of the metJ Locus and Properties of a metJ⁺/metJ⁻ Diploid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68 (1971) 367-371.

- SULLIVAN JR., J.D., IKAWA, M.: Purification and Characterization of Hexose Oxidase from the Red Alga Chondrus crispus. Biochim. Biophys. Acta 309 (1973) 11-22.
- SWITZER III, R.C., MERRIL, C.R., SHIFRIN, S.: A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. 98 (1979) 231-237.
- TABOR, H., TABOR, C.W.: Enzymatic Synthesis of Radioactive S-Adenosyl-L-Methionine. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (eds.). Academic Press New York London XVIIb (1970) 393-397.
- TREIMER, J.: Die Strictosidin-Synthase aus pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1979).
- TREIMER, J., ZENK, M.H.: Strictosidine Synthase from Cell Cultures of Apocynaceae Plants. FEBS Lett. 97 (1979) 159-162.
- VAN GELDER, B.F., SLATER, E.C.: The Extinction Coefficient of Cytochrome c. Biochim. Biophys. Acta 58 (1962) 593-595.
- WALSH, C.: Enzymatic Reaction Mechanisms. W.H. Freeman & Co. San Francisco (1979).
- WAT, C.-K., STEFFENS, P., ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of Norreticuline-N-Methyltransferase from Berberis Cell Suspension Cultures. Planta medica (1984), Manuskript eingereicht.
- WEBB, J.L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press New York London II (1966).
- WEBER, K., OSBORN, M.: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406-4412.
- WENKERT, E.: The Role of Oxidation in the Biosynthesis of Alkaloids. Experientia 10 (1954) 346-350.
- WENKERT, E.: Alkaloid Biosynthesis. Experientia 15 (1959) 165-173.
- WENKERT, E.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. The Aspidosperma and Iboga Bases. J. Am Chem. Soc. 84 (1962) 98-102.

- WINTERSTEIN, E., TRIER, G.: Die Alkaloide. Bornträger Berlin (1910).
- WOODWARD, R.B.: Neuere Entwicklungen in der Chemie der Naturstoffe. Angew. Chem. 68 (1956) 13-20.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentin and Ajmalicin in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application. Proceedings in Life Sciences. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1977) 27-43.
- ZENK, M.H.: Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids. J. Nat. Prod. 43 (1980) 438-451.
- ZENK, M.H.: Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung. In: Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin. Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. 112. Versammlung Mannheim 1982. Staab, H.A., Gerok, W., Markl, H., Martienssen, W., Gibian, H. (eds.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1982) 145-162.

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit freundlicherweise überließ, danke ich sehr herzlich für seine ständige Anteilnahme am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.

Ebenfalls gilt mein Dank allen Angehörigen und Gästen des Instituts für Pharmazeutische Biologie für vielseitige Ratschläge und anregende Diskussionen.

Dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, sei für die finanzielle Unterstützung gedankt. Empfänger der Finanzmittel war Prof. Dr. M. H. Zenk.

L e b e n s l a u f

Am 2. Mai 1952 wurde ich, Paul Steffens, als Sohn des Architekten Werner Steffens und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Schneider, in Karlsruhe geboren.

In den Jahren 1958 bis 1963 besuchte ich die Katholische Volksschule in Wattenscheid-Höntrop und trat anschließend in das Staatliche Gymnasium in Bochum ein. Dort legte ich im Sommer 1972 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. Im April 1980 legte ich die Diplom-Hauptprüfung ab und begann im Mai 1980 unter der Anleitung von Prof. Dr. M. H. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Von Mai bis Oktober 1980 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum, seit November 1980 am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München beschäftigt.

